



Joana Filipa Canais da Costa Sacramento

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Cafeína e resistência à insulina: qual o papel da adenosina?

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Sílvia Vilares Conde, Professor Auxiliar Farmacologia,
Faculdade Ciências Médicas, Universidade Nova Lisboa

Co-orientador: Maria Pedro Guarino, Professor Auxiliar Convidado
Fisiopatologia, Faculdade Ciências Médicas, Universidade Nova
de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Carlos Salgueiro

Arguente: Prof. Doutora Maria Graça Soveral

Vogal: Prof. Doutora Sílvia Vilares Conde



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2012

Joana Filipa Canais da Costa Sacramento

**Cafeína e resistência à insulina: qual o papel da
adenosina?**

Monte de Caparica

Setembro 2012

“Cafeína e resistência à insulina: qual o papel da adenosina?”

Copyright Joana Filipa Canais da Costa Sacramento, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Parte dos resultados discutidos nesta tese originaram:

Uma comunicação oral num congresso internacional:

- **Sacramento JF**, Ribeiro MJ, Guarino MP, Conde SV, (2012) The effect of acute caffeine administration on insulin sensitivity is mediated by A₁ and A_{2B} adenosine receptors. 6th European Congress of Pharmacology (EPHAR), 17 - 20 July, Granada, Spain.

Uma publicação em proceedings:

- **Sacramento JF**, Ribeiro MJ, Guarino MP, Conde SV, (2012) Are the acute caffeine effects on insulin sensitivity mediated by adenosine receptors?, EPHAR Proceedings

Durante este último ano realizou-se também trabalho experimental que originou:

Os seguinte artigos:

- Ribeiro MJ, **Sacramento JF**, Gonzalez C, Guarino MP, Monteiro EC, Conde SV. (2012) Carotid body: the missing piece in the puzzle of insulin resistance and sympathetic overactivation. (submetido)
- Guarino MP, Ribeiro MJ, **Sacramento JF**, Conde SV. (2012) Chronic caffeine intake reverses age-induced insulin resistance in the rat: effect on skeletal muscle Glut4 transporters and AMPK activity. Age, DOI: 10.1007/s11357-012-9475-x

As seguintes comunicações em congressos:

- **Sacramento JF**, Ribeiro MJ, Guarino MP, Conde SV, (2012) Chronic caffeine intake increases skeletal muscle Glut4 but not AMPK expression in aged rats. 10º Congresso Português de Diabetes, Vilamoura. (comunicação oral)
- **Sacramento J F**, Ribeiro MJ, Guarino MP, Monteiro EC, Conde SV, (2012) Chronic caffeine intake reverses age-induced insulin resistance in the rat. XLII Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, Lisboa. (comunicação oral)
- **Sacramento JF**, Ribeiro MJ, Gonzalez C, Antunes DD, Guarino MP, Conde SV (2012) Effect of chronic caffeine administration on Glut-4 and AMPK α 1 expression and plasma catecholamines in age-induced insulin resistance rats. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Berlin. (comunicação em forma de poster)

O seguinte prémio:

- Prémio Hargreaves 2012, Guarino MP, Ribeiro MJ, **Sacramento JF**, Antunes DD, Conde SV, Chronic caffeine intake reverses age-induced insulin resistance in the rat: effects on skeletal muscle glut4 expression and AMPK activity, Sociedade Portuguesa de Diabetologia (SPD) e Jaba Recordati.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Profª Doutora Maria Guarino e à Profª Doutora Sílvia Conde por me terem aceite no seu grupo, pela confiança em mim depositada e, pela oportunidade de realizar este trabalho. Gostaria também de agradecer a oportunidade de integrar outros projectos ao longo deste ano, o que enriqueceu em muito a minha formação. Em especial, gostava de agradecer também à Profª Doutora Sílvia Conde, todos os conhecimentos que me transmitiu ao longo deste ano bem como, pelas palavras de incentivo nos dias em que o trabalho não correu tão bem e, por me lembrar, que tal como “ser do Sporting”, os resultados menos bons, “formam carácter”.

Queria agradecer à Maria João Ribeiro, por me ter introduzido na metodologia “tão ingrata” que é o *Western blot*. Por animar o laboratório, sempre com os últimos *hits* da música brasileira. Por ter sido a minha companheira de laboratório e dos congressos ao longo deste ano bem como, de algumas saídas. Por esperar por mim para almoçar. Mas acima de tudo, queria agradecer por estares sempre disponível para o que for preciso. Obrigada!

Não posso também deixar de agradecer ao laboratório de Farmacologia da FCM/UNL, à Profª Doutora Sofia Pereira, à Dra. Joana Bатуca e, em especial à Inês Faustino, Aline Marino e Nádia Grilo, por fazerem parte do meu dia, pelas horas de almoço e pelas “pausas” no trabalho.

Aos amigos do mestrado, à Rita Otrelo pelas horas infindáveis na FCT, ao Milton Cordeiro que sempre fez parte dos meus grupos de trabalho desde que entrei na faculdade, à Viviana Correia pela sua força e determinação e, à Inês Camacho, minha ouvinte e amiga nas alegrias e nas tristezas ao longo destes dois últimos anos.

Aos amigos de longa data, à Andreia Mendes, à Audrey Lopes e à Magda Mendonça, pela amizade, mesmo quando estava ausente. Obrigada por todo o apoio e por animarem a minha vida.

Por último gostaria de agradecer à minha família, ao meu irmão e, em particular aos meus pais, por todo o esforço que fizeram por mim, de modo a me proporcionarem as oportunidades que nunca vos foram dadas, por todo o apoio, por acreditarem em mim e, acima de tudo por ser quem sou. OBRIGADA por serem um exemplo na minha vida.

Resumo

A diabetes do tipo 2 é um grave problema de saúde das sociedades ocidentais estando associado ao estilo de vida moderno. A cafeína é um antagonista não selectivo dos receptores de adenosina que quando administrada de forma aguda e crónica possui efeitos contrários na sensibilidade à insulina. Neste trabalho pretendeu-se investigar o(s) subtipo(s) de receptore(s) de adenosina que medeiam os efeitos da administração aguda e crónica de cafeína na sensibilidade à insulina. A administração aguda e crónica de diferentes antagonistas dos receptores de adenosina (cafeína; DPCPX, antagonista A_1 ; SCH58261, antagonista A_{2A} ; MRS1754, antagonista A_{2B}) foi testada em ratos *Wistar* controlo e submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). Nestes animais foi avaliada a sensibilidade à insulina, a pressão arterial, glicémia basal, insulinémia, gordura visceral e a expressão de transportadores Glut4 e AMPK no músculo-esquelético.

Observou-se que a administração aguda de cafeína diminuiu a sensibilidade à insulina de uma maneira dose-dependente, efeito este mediado pelos receptores A_1 e A_{2B} e, envolvendo um decréscimo dos Glut4 no músculo-esquelético. A administração aguda dos antagonistas dos receptores de adenosina não modificou a pressão arterial, a glicémia e insulinémia. Quanto à administração crónica dos diferentes antagonistas dos receptores de adenosina observou-se que: em animais controlo apenas o MRS1754 modificou a sensibilidade à insulina; nos animais submetidos a dieta HSu que o DPCPX e o MRS1754 aumentaram a sensibilidade à insulina, sendo o efeito deste último significativo; o MRS1754 reverteu a hipertensão nos animais HSu; o DPCPX reverteu o aumento de gordura visceral. A administração crónica de cafeína não alterou a expressão de Glut4 e fosforilação da AMPK α 1Thr¹⁷² no músculo-esquelético.

Em conclusão, o efeito da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina é mediado pelos receptores A_1 e A_{2B} . Por sua vez, os efeitos da cafeína crónica na pressão arterial e na sensibilidade à insulina parecem ser mediados pelos receptores A_{2B} , não se podendo excluir um efeito dos receptores A_1 e/ou A_{2A} na sensibilidade à insulina.

Termos chave: Diabetes tipo 2, resistência à insulina, cafeína, adenosina

Abstract

Type 2 diabetes is a chronic disease associated with the modern lifestyle. Caffeine is a non-selective adenosine antagonist, that when applied acutely or chronically have distinct effects on insulin sensitivity. The main objective of this work was to unravel the subtypes of adenosine receptors involved in the acute and chronic effects of caffeine intake on insulin sensitivity. The effect of acute and chronic administration of the different adenosine receptor antagonists (caffeine; DPCPX, A₁ antagonist; SCH58261, A_{2A} antagonist; MRS1754, A_{2B} antagonist) was tested in control Wistar rats and in rats fed with high-sucrose (Hsu) diet. Insulin sensitivity, mean arterial pressure, basal glycemia, insulinemia, visceral fat and the expression of Glut4 transporters as well as AMPK were evaluated.

Acute caffeine administration decreased insulin sensitivity in a dose-dependent manner, being this effect mediated by A₁ e A_{2B} receptors and involving a decrease in Glut4 expression in skeletal muscle. Furthermore, acute administration of the different adenosine receptors antagonist did not modify arterial pressure, fasting insulin and glucose levels.

Regarding the effects of chronic administration of the different adenosine antagonists it was observed that: in control animals only MRS1754 modify insulin sensitivity; in HSu animals both DPCPX and MRS1754 increased insulin sensitivity, being the effect of MRS1754 statistical significant; MRS1754 reversed hypertension in HSu group; DPCPX reversed the increase in visceral fat induced by HSu diet. Also, chronic caffeine administration did not modify Glut4 expression and AMPK α 1 activity in skeletal muscle.

In conclusion, the effect of acute caffeine administration on insulin sensitivity is mediated by A₁ and A_{2B} receptors. Moreover, the effects of chronic caffeine administration on arterial pressure and insulin sensitivity are mediated by A_{2B} receptors. However our results cannot exclude a contribution of A₁ and/or A_{2A} to insulin sensitivity.

Key words: Type 2 diabetes, insulin resistance, caffeine, adenosine

Índice de matérias

| | |
|--|-----------|
| Agradecimentos | vii |
| Resumo..... | ix |
| Abstract | xi |
| Índice de figuras | xvii |
| Índice de tabelas | xix |
| Abreviaturas | xxi |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Diabetes do tipo 2 | 1 |
| 1.1.1. Vias de transdução de sinal associadas ao receptor de insulina..... | 2 |
| 1.1.1.1. Vias de transdução de sinal do receptor de insulina na diabetes do tipo 2..... | 3 |
| 1.1.2. Homeostasia da glucose | 3 |
| 1.1.3. Homeostasia da glucose na diabetes do tipo2..... | 4 |
| 1.2. Cafeína..... | 5 |
| 1.2.1. Efeitos da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina..... | 6 |
| 1.2.2. Efeitos da administração crónica de cafeína na sensibilidade à insulina..... | 7 |
| 1.2.3. Mecanismos de acção celular da cafeína | 8 |
| 1.2.4. Cafeína e a proteína cinase adenosina 5'-monofosfato activada (AMPK) | 9 |
| 1.3. Adenosina | 10 |
| 1.3.1. Receptores de adenosina | 11 |
| 1.3.2. Distribuição dos receptores de adenosina no organismo | 11 |
| 1.3.3. Papel da adenosina no controlo da homeostasia da glucose e na sensibilidade à insulina..... | 12 |
| 1.3.3.1. Adenosina no tecido adiposo | 13 |
| 1.3.3.2. Adenosina no músculo-esquelético | 14 |
| 1.3.3.3. Adenosina no fígado..... | 15 |
| 1.4. Objectivos..... | 16 |
| 2. Materiais e Métodos..... | 17 |
| 2.1. Animais | 17 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.1.1. | Estudo do efeito da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina | 17 |
| 2.1.2. | Estudo do efeito da administração crónica de cafeína na sensibilidade à insulina | 18 |
| 2.2. | Teste de tolerância à insulina | 18 |
| 2.3. | Medição da pressão arterial média | 19 |
| 2.4. | Quantificação da insulina no plasma | 19 |
| 2.5. | Quantificação das catecolaminas no plasma | 19 |
| 2.6. | Recolha de tecidos | 19 |
| 2.7. | Análise por <i>western blot</i> da expressão proteica dos receptores de adenosina, transportadores Glut4, AMPK α 1 e actividade da AMPK α 1 através da fosforilação da AMPK α 1 Thr ¹⁷² | 20 |
| 2.7.1. | Análise por <i>western blot</i> de 2 passos da expressão proteica dos transportadores Glut4, AMPK α 1 e actividade da AMPK α 1 através da fosforilação da AMPK α 1 Thr ¹⁷² no músculo-esquelético | 20 |
| 2.7.2. | Análise por <i>western blot</i> de 3 passos da expressão proteica dos receptores de adenosina no músculo-esquelético e no cérebro | 21 |
| 2.8. | Fármacos e químicos | 21 |
| 2.9. | Análise de dados | 22 |
| 3. | Resultados | 23 |
| 3.1. | Efeitos da administração aguda dos antagonistas dos receptores de adenosina | 23 |
| 3.1.1. | Efeito da administração aguda de cafeína, DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na pressão arterial média | 23 |
| 3.1.2. | Efeito da administração aguda de cafeína, DMSO, DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na glicémia basal | 24 |
| 3.1.3. | Efeito da administração aguda de cafeína na insulinémia | 25 |
| 3.1.4. | Efeito da administração aguda de cafeína e DMSO na sensibilidade à insulina | 25 |
| 3.1.5. | Efeito da administração aguda de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na sensibilidade à insulina | 26 |
| 3.1.6. | Efeito da administração aguda de cafeína na expressão de AMPK α 1 e Glut4 no músculo-esquelético | 27 |
| 3.1.7. | Efeito da administração aguda de cafeína nas catecolaminas do plasma | 27 |
| 3.2. | Efeitos da administração crónica dos antagonistas dos receptores de adenosina | 27 |
| 3.2.1. | Efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na pressão arterial média | 28 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.2. | Efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na glicémia basal . | 28 |
| 3.2.3. | Efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na sensibilidade à insulina..... | 29 |
| 3.2.4. | Efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na gordura total e visceral | 30 |
| 3.2.5. | Efeito da administração crónica de cafeína na expressão de Glut4, AMPK α 1 e na fosforilação da AMPK α 1 Thr ¹⁷² no músculo-esquelético | 31 |
| 3.3. | Presença dos receptores de adenosina no músculo-esquelético soleus | 33 |
| 4. | Discussão dos Resultados..... | 35 |
| 4.1. | Efeitos da administração aguda dos antagonistas dos receptores de adenosina | 35 |
| 4.2. | Efeitos da administração crónica dos antagonistas dos receptores de adenosina..... | 38 |
| 5. | Conclusão | 43 |
| 6. | Trabalhos Futuros | 45 |
| 7. | Bibliografia | 47 |
| 8. | Anexos..... | 55 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1. Via de transdução de sinal da insulina, onde está representado o seu receptor e algumas moléculas envolvidas na acção da insulina | 3 |
| Figura 1.2. Tecidos e processos envolvidos na homeostasia da glucose (setas a preto) e na homeostasia da glucose na diabetes do tipo 2 (setas a vermelho). | 5 |
| Figura 1.3. Efeitos da cafeína nos seus diferentes alvos bioquímicos em relação aos seus níveis em humanos..... | 9 |
| Figura 1.4. Metabolismo da adenosina..... | 10 |
| Figura 3.1. Efeito da administração aguda de A) cafeína (antagonista não selectivo; 0,001-5 μ M), B) DPCPX (antagonista A ₁ ; 0,0005-5 μ M), C) SCH58261 (antagonista A _{2A} ; 0,0005-0,5 μ M) e D) MRS1754 (antagonista A _{2B} ; 0,001-5 μ M) na pressão arterial média (PAM)..... | 23 |
| Figura 3.2. Efeito da administração aguda de diferentes concentrações de cafeína (antagonista não selectivo; 0,001-5 μ M) na glicémia basal. | 24 |
| Figura 3.3. Efeito da administração aguda de A) diferentes diluições de DMSO (1:1000, 1:10000, 1:50000) e, diferentes concentrações de B) DPCPX (antagonista A ₁ ; 0,0005-5 μ M), C) SCH58261 (antagonista A _{2A} ; 0,0005-0,5 μ M) e D) MRS1754 (antagonista A _{2B} ; 0,001-5 μ M) na glicémia basal | 24 |
| Figura 3.4. Efeito da administração aguda cafeína (0,001-5 μ M) na insulinémia (n=1 – 8). | 25 |
| Figura 3.5. Efeito da administração aguda de diferentes concentrações de cafeína (0,001-5 μ M) e diferentes diluições de DMSO (1:1000, 1:10000 e 1:50000) na sensibilidade à insulina.. | 25 |
| Figura 3.6. Efeito da administração aguda de diferentes A) diluições de DMSO (1:1000, 1:10000 e 1:50000) e diferentes concentrações de cafeína (antagonista não selectivo, 0,001-5 μ M), SCH58261 (antagonista A _{2A} , 0,0005-0,5 μ M), B) DPCPX (antagonista A ₁ , 0,0005-5 μ M) e MRS1754 (antagonista A _{2B} , 0,001-5 μ M) na sensibilidade à insulina..... | 26 |
| Figura 3.7. Efeito da administração aguda de cafeína na expressão de AMPK α 1 e de Glut4 no músculo-esquelético. | 27 |
| Figura 3.8. Efeito da administração crónica de DPCPX (antagonista A ₁ , 0,4mg/kg), SCH58261 (antagonista A _{2A} , 0,5mg/kg) e MRS1754 (antagonista A _{2B} , 9,5 μ g/kg) na pressão arterial média (PAM) em ratos controlo e em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu).. | 28 |
| Figura 3.9. Efeito da administração crónica de DPCPX (antagonista A ₁ , 0,4mg/kg), SCH58261 (antagonista A _{2A} , 0,5mg/kg) e MRS1754 (antagonista A _{2B} , 9,5 μ g/kg) na glicémia basal em ratos controlo e em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). | 29 |
| Figura 3.10. Efeito da administração crónica de DPCPX (antagonista A ₁ , 0,4mg/kg), SCH58261 (antagonista A _{2A} , 0,5mg/kg) e MRS1754 (antagonista A _{2B} , 9,5 μ g/kg) na sensibilidade à insulina em ratos controlo e ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). | 30 |
| Figura 3.11. Efeito da administração crónica de DPCPX (antagonista A ₁ , 0,4mg/kg), SCH58261 (antagonista A _{2A} , 0,5mg/kg) e MRS1754 (antagonista A _{2B} , 9,5 μ g/kg) na A) gordura total e na B) gordura visceral, corrigida para a massa corporal, em ratos controlo e ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). | 31 |

Figura 3.12. Efeito do consumo crónico de cafeína na expressão dos Glut4 e AMPK α 1 e, na fosforilação da AMPK α 1 Thr¹⁷² no músculo-esquelético em ratos controlo e submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu) e rica em lípidos (HF).. 32

Figura 3.13. Análise por *western blot* da expressão dos receptores de adenosina A_{2A} (45kDa) no músculo-esquelético soleus e no cérebro..... 33

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1. Potência da cafeína para os receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 em ratos e humanos..... | 9 |
| Tabela 1.2. Distribuição e expressão dos receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , bem como, algumas das suas funções. | 12 |
| Tabela 3.1. Efeito máximo e IC_{50} da administração aguda de cafeína, DPCPX e MRS1754. | 26 |
| Tabela 8.1. Efeito da administração de DMSO (veículo) no K_{ITT} , glicémia basal, PAM e gordura total e visceral, em ratos controlo e em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu) | 55 |

Abreviaturas

AC – adenilato ciclase
ADA – adenosina deaminase
ADP – adenosina 5'-difosfato
AK – adenosina cinase
AMP – adenosina 5'-monofosfato
AMPK – proteína cinase adenosina 5'-monofosfato activada
ANOVA – *analysis of variance*
ATP – adenosina 5'-trifosfato
Caf – cafeína
cAMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CNT – transportadores de nucleosídeos concentrativos
CTR – controlo
DMSO – dimetilsulfóxido
DPCPX – *8-cycle-1,3-dipropylxanthine*
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ENT – sistema de transporte de nucleosídeos equilibravito
GABA - Ácido gama-aminobutírico
Glut4 – transportadores de glucose 4
HF – *high-fat*
HFCaf – *high-fat* com cafeína
HSL – lipase hormona sensível
HSu – *high-sucrose*
HSuCaf – *high-sucrose* com cafeína
IC₅₀ – *half maximal inhibitory concentration*
IL-6 – interleucina-6
IMC – índice de massa corporal
I.p. - intraperitoneal
IRS – substrato do receptor de insulina
ITT – Teste de tolerância à insulina
K_{ITT} – constante de tolerância à insulina
MAPK – proteína cinase activada pelo mitogénio
mRNA – RNA mensageiro

MRS1754 – 8-(4-{{(4-cyanophenyl)carbamoylmethyl}-oxy}phenyl)-1,3-di(n-propyl)xanthine

NEFA – ácidos gordos não-esterificados

PAM – pressão arterial média

PDE – fosfodiesterase

PI3K – fosfaditilinositol 3-cinase

PKB – proteína cinase B

SAH – S-adenosil-homocisteína

SAHase – S-adenosil homocisteína hidrolase

SCH58261 – 2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine

SHC – *Src-homology-2-containing protein*

TBS – Tampão Tris salino

TTBS – Tampão Tris salino com *Tween*

1. Introdução

1.1. Diabetes do tipo 2

A diabetes mellitus é um grave problema de saúde pública, sendo uma das doenças crónicas mais comuns nos países Ocidentais/desenvolvidos. O número de indivíduos com esta doença continua a aumentar, devido às mudanças no estilo de vida, que se caracterizam por uma menor prática de actividade física, um aumento da obesidade e alterações alimentares. Estima-se que em 2010 o número de pessoas com diabetes rondasse os 285 milhões de pessoas sendo a estimativa para 2030 de 439 milhões (Shaw *et al.*, 2010). Em Portugal, se forem considerados os pré-diabéticos, estima-se que cerca de um terço da população entre os 20 e os 79 anos sofra de diabetes, pensando-se que exista um elevado número de pessoas com diabetes não diagnosticada (Gardete-Correia *et al.*, 2010).

Na pré-diabetes, os indivíduos exibem valores de glucose superiores ao normal (< 126 mg/dl), mas abaixo dos valores considerados para a diabetes do tipo 2, apresentando resistência à insulina e disfunção das células β (Tabák *et al.*, 2012).

A diabetes do tipo 2 caracteriza-se pela presença de problemas ao nível da secreção de insulina (disfunção das células β) (Kahn, 2000) e ao nível da sua acção (resistência à insulina), o que leva a uma hiperglicémia e, como tal, a uma impossibilidade dos tecidos de utilizarem glucose, o que diminui a sua disponibilidade no organismo (Robinson *et al.*, 2004). A disfunção das células β ocorre devido a uma sobrecarga metabólica e ao stress oxidativo, o que provoca a apoptose das células β e, a perda da expressão de componentes que são fundamentais para a secreção da insulina (Ríos e Fuentes, 2009). A resistência à insulina caracteriza-se pela incapacidade dos órgãos sensíveis à insulina, ou seja, o fígado, o músculo e o tecido adiposo, responderem à insulina. A combinação da resistência à insulina e, a subsequente hiperinsulinémia, provoca várias alterações metabólicas e cardiovasculares, que são denominadas por síndrome metabólico, que envolve a diabetes do tipo 2, obesidade, dislipidémia, doença arterial coronária e hipertensão (Kashyap e DeFronzo, 2007).

Sabendo que a diabetes do tipo 2 está associada a um estilo de vida sedentário e à obesidade, vários estudos têm vindo a ser realizados, de modo a averiguar como intervenções ao nível do estilo de vida, poderiam diminuir o risco de desenvolvimento de diabetes do tipo 2. Num estudo realizado em mulheres, acompanhadas durante 16 anos, a análise dos dados recolhidos por inquérito, demonstrou que o aumento de peso é o factor que mais contribui para o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 (Hu *et al.*, 2001). Foi também observado que a perda de peso, prática regular de exercício físico, alteração da dieta, abstinência de hábitos tabágicos e consumo limitado de álcool, são factores que podem prevenir o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 (Hu *et al.*, 2001). Estes resultados foram também demonstrados em homens e mulheres com excesso de peso e com

tolerância diminuída à glucose (Tuomilehto *et al.*, 2001; Lindström *et al.*, 2006). Neste caso, o grupo de indivíduos que alterou o seu estilo de vida apresentou um menor risco de desenvolver diabetes do tipo 2 (Tuomilehto *et al.*, 2001; Lindström *et al.*, 2006).

Relativamente à dieta, é recomendado o consumo de frutas, vegetais, leite e carne com baixo teor em gordura, entre outros (Tuomilehto *et al.*, 2001). Vários estudos epidemiológicos têm sugerido também os efeitos benéficos da cafeína na diminuição do risco de diabetes de tipo 2 (van Dam e Feskens, 2002).

1.1.1. Vias de transdução de sinal associadas ao receptor de insulina

Para exercer o seu efeito no metabolismo da glucose, a insulina liga-se a um receptor específico que está presente nos tecidos alvo da insulina. O receptor de insulina é uma glicoproteína formada por duas subunidades α e duas subunidades β . As subunidades α são extracelulares e contêm o domínio de ligação da insulina. As subunidades β apresentam um domínio extracelular, um transmembranar e um intracelular, que expressa actividade cinase estimulada pela insulina (para uma revisão ver Saltiel e Kahn, 2001).

O primeiro passo para a acção da insulina no metabolismo consiste na fosforilação da subunidade β do receptor de insulina e, subsequente activação da tirosina cinase do receptor (Fig.1.1). Esta activação inicia a ligação de várias proteínas, entre elas, os substratos para o receptor de insulina (IRS) e *Src-homology-2-containing protein* (SHC). A IRS1 está envolvida na captação de glucose estimulada pela insulina e na activação de vias anabólicas no músculo e nos adipócitos. Por sua vez, a IRS2, está envolvida nos mesmos processos no fígado. A fosforilação da IRS1 e IRS2 leva à sua associação com o fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K), que é formada por subunidade reguladora p85 e uma subunidade catalítica p110. A activação da PI3K inicia a cascata de sinalização, que activa várias proteínas, entre elas a proteína cinase B (PKB/AKT). A activação da PKB/AKT resulta na translocação de vesículas com transportadores de glucose 4 (Glut4) para a superfície da célula, o que diminui a concentração de glucose em circulação (Ríos e Fuentes, 2009).

Outra via presente na transdução de sinal do receptor de insulina, ocorre através de Grb2/Sos e ras, o que leva à activação da proteína cinase activada pelo mitogénio (MAPK), que está envolvida no crescimento e diferenciação celular (Cusi *et al.*, 2000).

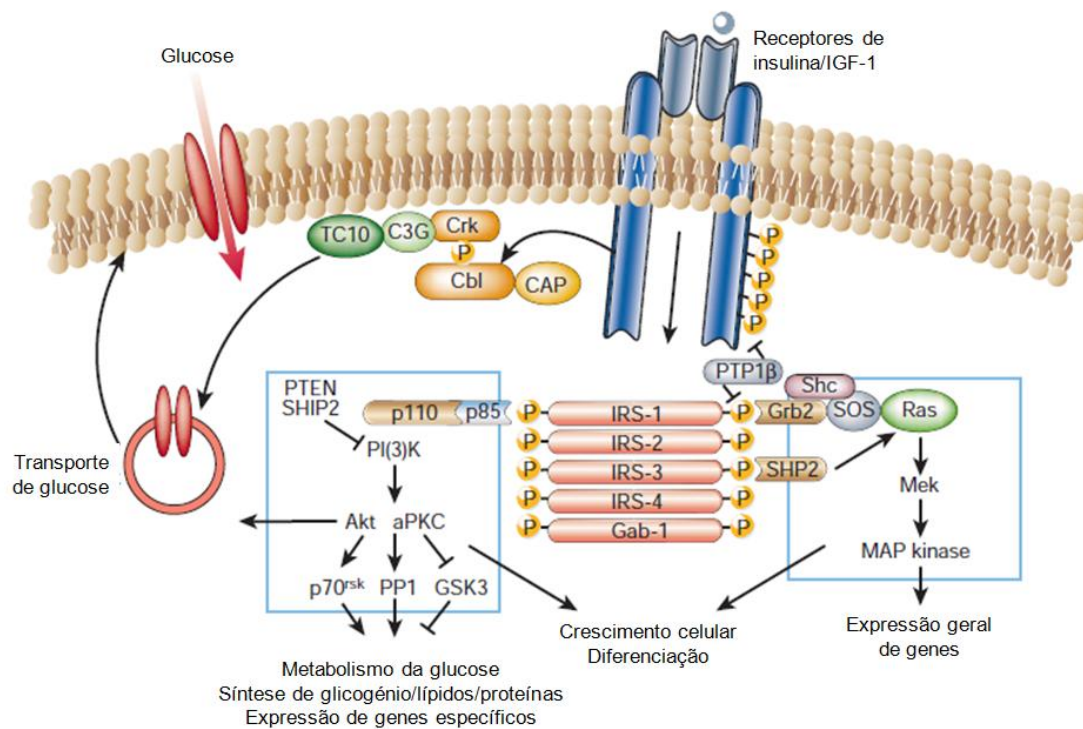


Figura 1.1. Via de transdução de sinal da insulina, onde está representado o seu receptor e algumas moléculas envolvidas na acção da insulina. (ver detalhes no texto) (adaptado de Saltiel e Kahn, 2001).

1.1.1.1. Vias de transdução de sinal do receptor de insulina na diabetes do tipo 2

Na diabetes do tipo 2 foram observados vários problemas ao nível das vias de transdução de sinal do receptor de insulina. Um dos problemas que ocorre ao nível do receptor de insulina é a redução da actividade tirosina cinase estimulada pela insulina (Saltiel e Kahn, 2001). Para além disso, em indivíduos com resistência à insulina obesos e com diabetes do tipo 2, observa-se resistência à insulina na via da PI3K, enquanto a via da MAPK parece estar mantida (Cusi *et al.*, 2000). Outros problemas observados na transdução de sinal do receptor de insulina na diabetes do tipo 2 incluem, a redução na associação da proteína p85 e PI3K com a IRS1 (Cusi *et al.*, 2000).

1.1.2. Homeostasia da glucose

Após uma noite de jejum (10-12 horas) a grande maioria da glucose é utilizada pelos tecidos independentes de insulina. Aproximadamente 50% é utilizada pelo cérebro, 25% pelo fígado e tecidos gastrointestinais. Os restantes 25% são utilizados pelos tecidos dependentes de insulina, sendo o músculo-esquelético o principal órgão captador de glucose. Relativamente à produção de glucose, 85% ocorre no fígado e os restantes 15% no rim. É ainda de referir que a produção hepática de glucose deriva do igual contributo da glicogenólise e da gluconeogénese (DeFronzo, 2004).

Após a ingestão de glucose, o aumento da sua concentração plasmática estimula a libertação de insulina das células β . A combinação entre a hiperinsulinémia e a hiperglicémia suprime a produção de glucose, principalmente ao nível hepático e, estimula a captação de glucose esplanquica e, pelos tecidos periféricos, principalmente o músculo (DeFronzo *et al.*, 1995).

A grande maioria da captação de glucose nos tecidos periféricos ocorre no músculo e, apenas uma pequena parte, ocorre no tecido adiposo (DeFronzo *et al.*, 1985). Existem diferentes transportadores de glucose, porém o principal transportador que responde à insulina no músculo-esquelético e no tecido adiposo é o Glut4 (Watson e Pessin, 2001). Apesar de no tecido adiposo apenas uma pequena parte da glucose seja captada, este órgão desempenha um papel fundamental ao nível da homeostasia da glucose em todo o organismo (para uma revisão ver Boden e Shulman, 2002). A insulina é uma hormona antilipolítica e, deste modo actua no tecido adiposo inibindo a lipólise, o que diminui os níveis de ácidos gordos livres. A acção antilipolítica da insulina ocorre através da sua ligação ao receptor de insulina na superfície da célula, o que inicia a cascata de sinalização que envolve a activação de substratos do IRS e da PI3K (ver secção 1.1.1), o que activa a fosfodiesterase 3A. Este enzima catalisa a hidrólise da proteína adenosina 5'-monofosfato cíclico (cAMP) em 5'AMP, diminuindo os níveis de cAMP intracelular, o que significa que há uma menor activação da proteína cinase A e da lipase hormona sensível (HSL). Deste modo, ocorre uma diminuição da hidrólise dos triglicéridos em ácidos gordos e glicerol, ocorrendo assim, a inibição da lipólise (para uma revisão ver Arner, 2005). Esta diminuição da concentração de ácidos gordos livres no plasma resulta num aumento da captação de glucose no músculo e, contribui para a inibição da produção hepática de glucose (Bergman, 2000).

Também o glucagon desempenha um papel central na regulação da homeostasia da glucose. Após uma noite de jejum, cerca de metade da glucose que é libertada pelo fígado depende da manutenção dos níveis basais de glucagon. Por outro lado, após a ingestão de glucose, a secreção de glucagon é inibida pela hiperinsulinémia, o que contribui para a supressão da produção hepática de glucose e, para a manutenção da tolerância à glucose pós-prandial (DeFronzo, 2004).

Assim, a homeostasia da glucose é garantida pelo balanço entre a produção de glucose e a captação de glucose pelos tecidos periféricos.

1.1.3. Homeostasia da glucose na diabetes do tipo2

Como referido anteriormente, a diabetes do tipo 2 caracteriza-se por problemas na secreção de insulina e, por resistência à insulina no músculo, fígado e tecido adiposo. Em indivíduos com diabetes do tipo 2, após uma refeição, ocorre uma elevada produção hepática de glucose, apesar das concentrações plasmáticas de insulina, o que evidencia a resistência hepática à acção da insulina (Firth *et al.*, 1986). A elevada produção de glucose na diabetes de tipo 2 deve-se em grande parte à

gluconeogénese e, está correlacionada com o aumento dos níveis de glucose em jejum (Magnusson *et al.*, 1992).

Tal como o fígado, na diabetes do tipo 2 o músculo apresenta também resistência à insulina, contribuindo para uma diminuição da captação de glucose. Através de um *clamp* hiperinsulinémico-euglicémico realizado em indivíduos com diabetes do tipo 2, observou-se que o primeiro local no qual se desenvolve resistência à insulina no organismo é o músculo-esquelético (DeFronzo *et al.*, 1985). A diminuição da captação de glucose no músculo-esquelético, tal como o aumento da produção hepática de glucose, contribuem para a hiperglicémia no estado pós-prandial.

Na diabetes tipo 2 ocorre também uma diminuição da acção da insulina no tecido adiposo e, como tal, uma diminuição da capacidade da insulina em inibir a lipólise, o que promove o aumento dos níveis de ácidos gordos livres. Este aumento dos ácidos gordos livres no plasma induz resistência à insulina no músculo-esquelético e fígado (Boden e Chen, 1995) e, leva a uma diminuição da secreção de insulina (Kashyap *et al.*, 2003). Assim, os elevados níveis de ácidos gordos livres no plasma contribuem para o aumento da produção hepática de glucose (Boden *et al.*, 2001) e, diminuição da captação de glucose pelo músculo-esquelético (Fig.1.2) (Roden *et al.*, 1996).

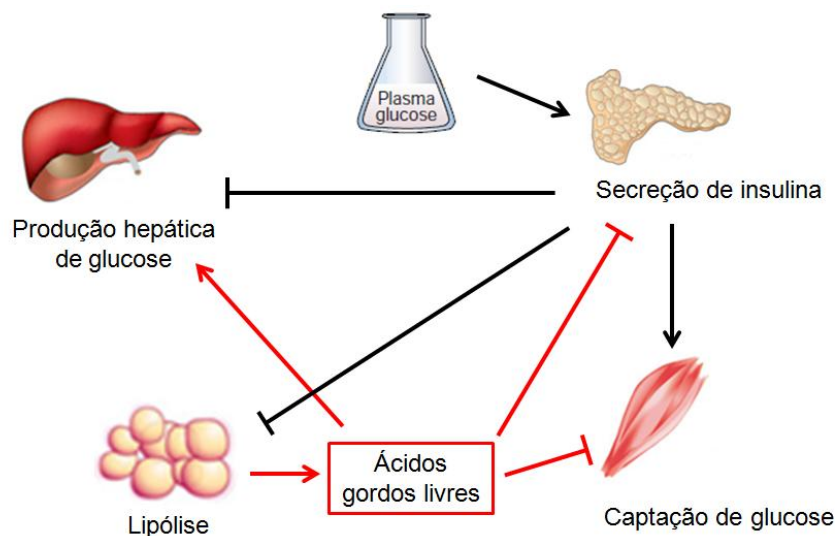


Figura 1.2. Tecidos e processos envolvidos na homeostasia da glucose (setas a preto) e na homeostasia da glucose na diabetes do tipo 2 (setas a vermelho). Elevadas concentrações de glucose estimulam a secreção de insulina pelo pâncreas, o que aumenta a captação de glucose no músculo-esquelético e, diminui a produção hepática de glucose e a lipólise no tecido adiposo. Por outro lado, na diabetes do tipo 2, ocorre um aumento dos níveis de ácidos gordos livres em circulação, o que aumenta a produção hepática de glucose e, diminui a secreção de insulina no pâncreas e a captação de glucose no músculo-esquelético.

1.2. Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é a substância psicoactiva mais consumida no mundo. Esta está presente em vários alimentos e bebidas das dietas ocidentais como, são exemplos, o café, o chá, os refrigerantes e os chocolates. O consumo anual de café está estimado em 70 a 76mg/pessoa/dia e,

na maioria dos países europeus, o consumo ronda os 202 a 390mg/pessoa/dia (Fredholm *et al.*, 1999). O café apresenta na sua constituição diversas substâncias que podem afectar o metabolismo da glucose tais como a cafeína, o ácido clorogénico e o magnésio (van Dam e Feskens, 2002; van Dam *et al.*, 2004). Foi descrito anteriormente que o ácido clorogénico pode reduzir a produção de glucose hepática através da inibição da hidrólise da glucose-6-fosfato (van Dam *et al.*, 2004) e que, o magnésio está associado ao baixo risco de se desenvolver diabetes do tipo 2 (Meyer *et al.*, 2000). Relativamente à cafeína, a sua administração aguda e crónica, apresenta efeitos opostos na sensibilidade à insulina os quais serão focados na presente dissertação.

1.2.1. Efeitos da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina

Vários estudos sugerem que a administração aguda de cafeína está associada ao aumento da resistência à insulina em indivíduos saudáveis (Greer *et al.*, 2001; Keijzers *et al.*, 2002; Moisey *et al.*, 2008), em obesos (Petrie *et al.*, 2004) e em doentes com diabetes do tipo 2 (Robinson *et al.*, 2004; Lane *et al.*, 2004). No estudo de Keijzers *et al.* (2002), realizado em indivíduos saudáveis e magros, nos quais a sensibilidade à insulina foi avaliada através de um *clamp* hiperinsulinémico-euglicémico, 30 minutos após a administração intravenosa de cafeína (3mg/kg), observou-se um aumento da epinefrina e, uma diminuição dos ácidos gordos livres e da sensibilidade à insulina. Neste mesmo estudo, foi observado que a hiperinsulinémia por si só leva a um aumento da frequência cardíaca, das catecolaminas e, a um decréscimo dos ácidos gordos livres. Por outro lado, os efeitos observados apenas com a administração intravenosa de cafeína foram um aumento da pressão arterial, das catecolaminas, principalmente da epinefrina, e dos ácidos gordos livres, ou seja, da lipólise (Keijzers *et al.*, 2002). Também no estudo de Greer *et al.* (2001), realizado em indivíduos saudáveis e magros, os resultados do *clamp* hiperinsulinémico-euglicémico, após a administração oral de cafeína (5mg/kg), mostraram um aumento da epinefrina e, um decréscimo dos níveis de ácidos gordos livres, glicerol e da captação de glucose. Para além disso, em homens saudáveis, a ingestão de café (5mg de cafeína/kg) uma hora antes de uma refeição com baixo ou elevado índice glicémico, diminui a sensibilidade à insulina, quando comparado com a ingestão de descafeinado (Moisey *et al.*, 2008).

Num trabalho realizado em homens obesos (Petrie *et al.*, 2004) foi estudado o efeito da administração aguda de cafeína (cápsula com 5mg/kg, equivalente a 3-4 cafés) na homeostasia da glucose e da insulina antes e depois de uma intervenção de doze semanas, ao nível nutricional e do exercício físico. Durante este período de tempo não ocorreu consumo de cafeína nos indivíduos incluídos no referido estudo. A intervenção por si só diminuiu o peso e a massa gorda dos indivíduos em estudo bem como, a concentração de glucose no plasma em jejum e a insulina no soro. Contudo, a intervenção não melhorou a resistência à insulina induzida pela cafeína nos indivíduos obesos, uma

vez que os efeitos da cafeína na glucose e insulina, em resposta a uma prova de tolerância à glucose oral, não foram significativos ao longo do tempo.

Em indivíduos com diabetes do tipo 2, sedentários e obesos, a administração aguda de cafeína (cápsulas de 5mg/kg) aumentou os níveis de ácidos gordos livres e glicerol não alterando os níveis de glucose e insulina. Contudo, após o início da prova de tolerância à glucose oral, observou-se um aumento da concentração de insulina e glucose, o que demonstra que a administração aguda de cafeína está associada ao aparecimento de resistência à insulina (Robinson *et al.*, 2004). O aumento da concentração de glucose e insulina foi também observado em indivíduos com diabetes do tipo 2 após um teste de tolerância a uma refeição-mista, que consistiu na ingestão de 75g de hidratos de carbono. Este teste foi precedido da ingestão de 375mg cafeína (Lane *et al.*, 2004). Assim, observou-se que a administração aguda de cafeína exerce um efeito negativo no metabolismo da glucose pós-prandial em indivíduos com diabetes do tipo 2.

1.2.2. Efeitos da administração crónica de cafeína na sensibilidade à insulina

Contrariamente aos efeitos da administração aguda de cafeína, vários estudos epidemiológicos sugerem que a administração crónica de cafeína esteja associada à diminuição do risco de diabetes do tipo 2 e de síndrome metabólica (van Dam e Feskens, 2002; van Dam *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006; Lopez-Garcia *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). Demonstrou-se que os indivíduos que apresentavam valores de normoglicémia em jejum eram os que consumiam habitualmente maior quantidade de café (≥ 5 cafés/dia) (Smith *et al.*, 2006) e que, o consumo de café decrescia as concentrações de glucose após o início da prova de tolerância à glucose oral e, a tolerância diminuída à glucose (van Dam *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem que o elevado consumo de café esteja associado ao aumento da sensibilidade à insulina. Observou-se também uma diminuição do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 com o consumo habitual de café em que indivíduos que inicialmente apresentavam intolerância à glucose (van Dam *et al.*, 2004). Estes resultados bem como, os obtidos para os indivíduos sem intolerância à glucose, foram independentes da idade, sexo, prática de exercício físico, hábitos tabágicos, consumo de álcool, índice de massa corporal (IMC) e hipertensão (Smith *et al.*, 2006).

Outros estudos observaram também que o elevado consumo de café (≥ 7 cafés/dia) está associado a um menor risco de desenvolver diabetes do tipo 2 (van Dam e Feskens, 2002; Hu *et al.*, 2006). Quando se compararam indivíduos não obesos, que praticavam muita actividade física e que bebiam pelo menos 7 cafés por dia com, indivíduos obesos, que praticavam pouca actividade física e bebiam menos de 2 cafés por dia, estes últimos apresentaram 11× mais probabilidade de desenvolverem diabetes do tipo 2 (Hu *et al.*, 2006). Foi também observado que o aumento do

consumo de café apresenta uma relação inversa com a pressão arterial, consumo de chá, consumo de álcool e consumo diário de fruta e vegetais em ambos os sexos (Hu *et al.*, 2006).

Em mulheres saudáveis e com diabetes do tipo 2 foi também estudado o efeito do consumo crónico de cafeína nos marcadores de inflamação e na disfunção endotelial, que são características fisiopatológicas que se encontram presentes no síndrome metabólico. Aqui observou-se que o consumo de café está inversamente associado aos marcadores de inflamação e à disfunção endotelial, quer em mulheres saudáveis, quer em mulheres com diabetes do tipo 2, o que indica que o café parece exercer um efeito protector no síndrome metabólico (Lopez-Garcia *et al.*, 2006).

Dado que o café, tal como foi dito anteriormente possui várias substâncias capazes de modificar a sensibilidade à insulina, tronava-se imperativo averiguar se a substância por detrás do efeito sensibilizador do café era a cafeína. Assim, o efeito do consumo crónico de cafeína na sensibilidade à insulina foi avaliado em ratos *Wistar* submetidos a dietas hipercalóricas (modelos de hipertensão e resistência à insulina; Storlien *et al.*, 1986; Kaufman *et al.*, 1991; Sumiyoshi *et al.*, 2006), tendo estes sido submetidos a 1g/l de cafeína, uma dose correspondente a aproximadamente 3-4 cafés por dia no Homem, durante 15 dias. Observou-se que o consumo crónico de cafeína previne o desenvolvimento de resistência à insulina e hipertensão em ratos submetidos a dietas hipercalóricas, um efeito que parece ser mediado por uma inibição do sistema nervoso simpático, uma vez que o consumo crónico de cafeína reverte os níveis de catecolaminas plasmáticas para valores controlo. Este efeito sobre o sistema nervoso simpático foi consolidado pelo facto de se observar que o carvedilol, um antagonista dos adrenoreceptores β_1 , β_2 e α_1 , tal como a cafeína, previne o desenvolvimento de resistência à insulina (Conde *et al.*, 2012).

1.2.3. Mecanismos de acção celular da cafeína

Ao nível celular a cafeína apresenta três mecanismos de acção (Fig.1.3). Para concentrações superiores às do consumo humano, na ordem dos milimolar, a cafeína provoca a libertação de cálcio das reservas intracelulares e inibe as fosfodiesterases do cAMP. Para concentrações semelhantes à do consumo humano, a cafeína bloqueia os receptores de adenosina (Fredholm *et al.*, 1999).

As xantinas e derivados das xantinas, incluindo os derivados naturais teofílina e cafeína, são antagonistas não selectivos dos receptores de adenosina (Ralevic e Burnstock, 1998). A cafeína é mais potente para os receptores A_{2A} e menos potente para os receptores A_3 (Tabela 1.1) (Fredholm *et al.*, 1999).

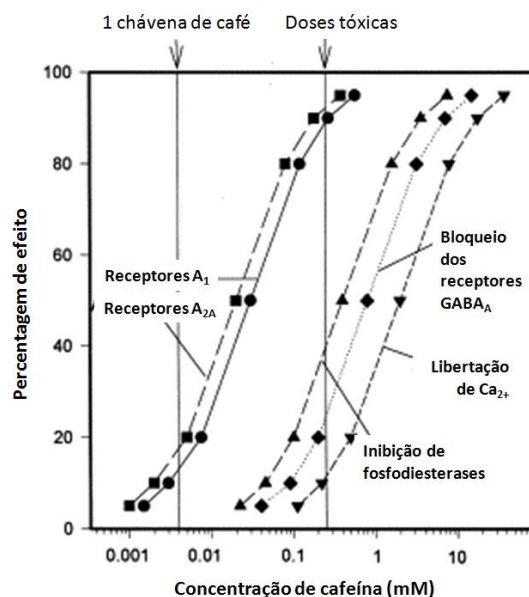


Figura 1.3. Efeitos da cafeína nos seus diferentes alvos bioquímicos em relação aos seus níveis em humanos. É de referir que a cafeína inibe os receptores de adenosina após uma única chávena de café. Para inibir as fosfodiesterases do cAMP é necessária uma concentração 20 vezes superior e, para libertar o cálcio das reservas intracelulares, é necessária uma concentração 100 vezes superior (Adaptado de Fredholm *et al.*, 1999).

Tabela 1.1. Potência da cafeína para os receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 em ratos e humanos.

| Receptores de adenosina | Rato (K_D) (μM) | Humanos (K_D) (μM) |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| A_1 | 20 | 12 |
| A_{2A} | 8,1 | 2,4 |
| A_{2B} | 17 | 13 |
| A_3 | 190 | 80 |

Tabela retirada de Fredholm *et al.* 1999.

1.2.4. Cafeína e a proteína cinase adenosina 5'-monofosfato activada (AMPK)

Para além dos efeitos da cafeína na sensibilidade à insulina, foi também descrito que esta xantina activa a AMPK (Egawa *et al.*, 2009 e Egawa *et al.*, 2011). A AMPK é um sensor metabólico que está envolvido no metabolismo da glucose e dos lípidos em vários órgãos, principalmente no músculo-esquelético e no fígado. No músculo-esquelético, a AMPK estimula a captação de glucose, uma vez que promove o recrutamento dos transportadores Glut4 para a membrana plasmática e, promove a oxidação de ácidos gordos. No fígado a AMPK aumenta a oxidação de ácidos gordos, diminui a síntese de colesterol e triglicéridos e, inibe a gluconeogénese, o que diminui a produção de glucose (para uma revisão ver Viollet *et al.*, 2009 e Gruzman *et al.*, 2009). No tecido adiposo a AMPK aumenta a oxidação de ácidos gordos e diminui a lipólise, lipogénese e a síntese de triglicéridos (para uma revisão ver Daval *et al.*, 2006). Todos estes efeitos metabólicos da AMPK têm como objectivo diminuir a glicémia em estados de hiperglicémia.

1.3. Adenosina

A adenosina é um produto do metabolismo do ATP, sendo um mediador de diversas funções fisiológicas e fisiopatológicas no organismo como, por exemplo, endócrina, cardiovascular, imune, renal e do sistema nervoso central (Poulsen e Quinn, 1998; Fredholm *et al.*, 2001 e Conde *et al.*, 2009).

A adenosina é maioritariamente formada pelo catabolismo dos 5'adenosina fosfatos (adenosina 5'-trifosfato - ATP, adenosina 5'-difosfato - ADP e AMP). No espaço intracelular, a adenosina é formada pela degradação do AMP pela 5'-nucleotidase ou pela hidrólise de S-adenosil-homocisteína (SAH) (Fig.1.4) (Fredholm *et al.*, 1999). No espaço extracelular, a adenosina é produzida através do catabolismo do ATP por 5'-ectonucleotidases ou por degradação do cAMP. O cAMP é libertado para o espaço extracelular onde é convertido em AMP e, por fim em adenosina por 5'-ectonucleotidases (Conde *et al.*, 2009).

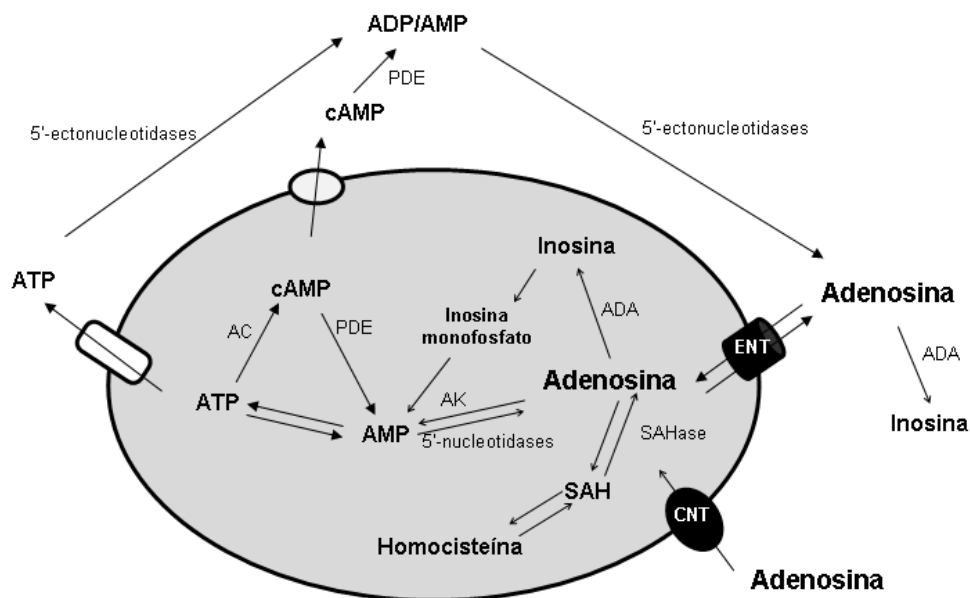


Figura 1.4. Metabolismo da adenosina. AC, adenilato ciclase; ADA, adenosina deaminase; AK, adenosina cinase; CNT, transportadores de nucleosídeos concentrativos; ENT, sistema de transporte de nucleosídeos equilibrativo; PDE, fosfodiesterase; SAH, S-adenosil-homocisteína; SAHase, S-adenosil homocisteína hidrolase. (Adaptado de Latini e Pedata, 2001; Conde *et al.*, 2009)

As concentrações intra- e extracelulares de adenosina são mantidas em equilíbrio por duas famílias de transportadores: dependentes de sódio, que transportam a adenosina para o espaço intracelular (transportadores de nucleosídeos concentrativos, CNT) e, independentes de sódio, cujo transporte é bi-direccional (sistema de transporte de nucleosídeos equilibrativo, ENT) (Fredholm *et al.*, 1999; Latini e Pedata, 2001; Conde *et al.*, 2009). Existem duas enzimas que constituem a maior via para a degradação da adenosina: a adenosina cinase (AK) e a adenosina deaminase (ADA). A adenosina cinase é uma enzima intracelular que converte a adenosina em AMP, sendo activada por concentrações fisiológicas de adenosina (Fredholm *et al.*, 1999). A adenosina deaminase está

maioritariamente presente no espaço intracelular e converte a adenosina em inosina, sendo esta enzima de particular importância quando as concentrações de adenosina são elevadas (Arch e Newsholme, 1978).

1.3.1. Receptores de adenosina

Existem quatro receptores de adenosina bem definidos farmacologicamente, receptores A_1 , receptores A_2 , que estão subdivididos em A_{2A} e A_{2B} e, por último, receptores A_3 . Os receptores de adenosina são receptores acoplados a proteínas G. Inicialmente, a divisão entre os receptores A_1 e os A_2 baseava-se no facto de inibirem e estimularem a adenilato ciclase, respectivamente, ou seja, estariam acoplados a proteínas G_i e G_s (Fredholm *et al.*, 2000). Hoje sabe-se que os receptores A_1 , para além de estarem acoplados a proteínas $G_{i1/2/3}$, também podem estar acoplados a proteínas G_o . Já os receptores A_{2A} e A_{2B} , para além de estarem acoplados a proteínas G_s , podem também activar G_{olf} e G_q , respectivamente. Relativamente aos receptores A_3 , estes activam maioritariamente proteínas $G_{i/o}$, mas também podem activar G_q (Fredholm *et al.*, 2001).

Após a activação das proteínas G, enzimas e canais iónicos são afectados. Os receptores A_1 , como já referido anteriormente, medeiam a inibição da adenilato ciclase e, também medeiam a activação de diversos tipos de canais de K^+ , inibem os canais Ca^{2+} do tipo N, O e Q, activam a fosfolipase C, entre outros (Fredholm *et al.*, 1994; Fredholm *et al.*, 2001). Os receptores A_3 aparentam mediar os mesmos efeitos que os receptores A_1 . Em relação aos receptores A_{2A} e A_{2B} , estes para além de activarem a adenilato ciclase, estimulam a formação de cAMP e, também medeiam a mobilização de cálcio intracelular (Fredholm *et al.*, 2001). Os receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 são activados por diferentes concentrações endógenas de adenosina (afinidade para adenosina: $A_1 > A_{2A} > A_{2B} > A_3$) (Conde *et al.*, 2009).

1.3.2. Distribuição dos receptores de adenosina no organismo

A distribuição dos receptores de adenosina torna-se de extrema importância quando se pretende administrar agonistas ou antagonistas num organismo intacto, uma vez que nos permite saber onde é que estes compostos poderão actuar, mas também, quais serão os locais onde a sua acção será mais acentuada. Em relação aos receptores A_1 a sua distribuição é particularmente ubíqua no sistema nervoso central. O seu RNA mensageiro (mRNA) também se encontra amplamente distribuído nos tecidos periféricos como, por exemplo, tecido adiposo branco, coração e fígado (Ralevic e Burnstock, 1998).

Os receptores A_{2A} têm uma distribuição ampla mas restrita que inclui plaquetas, o sistema nervoso central, o músculo liso vascular e o endotélio. Os receptores A_{2B} podem ser encontrados em praticamente todas as células da maioria das espécies contudo, o seu número é reduzido e,

geralmente, é necessária uma elevada concentração de adenosina para gerar uma resposta. Análises por *Northem blot* revelaram uma elevada expressão destes receptores no intestino grosso e, uma menor expressão no cérebro, pulmões, entre outros. Por último, o mRNA dos receptores A_3 é expresso, por exemplo, nos testículos, pulmões e cérebro (Ralevic e Burnstock, 1998).

Na tabela 1.2 encontra-se sumariada a distribuição e algumas das funções dos diferentes receptores de adenosina.

Tabela 1.2. Distribuição e expressão dos receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , bem como, algumas das suas funções.

| | Receptor A_1 | Receptor A_{2A} | Receptor A_{2B} | Receptor A_3 |
|--------------------|---|---|--|--|
| Expressão | <p>Níveis elevados: Cérebro (córtex, cerebelo, hipocampo), medula espinal, olho, glândula adrenal e aurículas.</p> <p>Níveis intermédios: Outras regiões do cérebro, músculo-esquelético, fígado, rim, tecido adiposo, glândulas salivares, esófago, cólon, antro e testículos.</p> <p>Níveis baixos: Pulmão e pâncreas.</p> | <p>Níveis elevados: Baço, timo, leucócitos, plaquetas, neurónios GABAérgicos e bulbo olfativo.</p> <p>Níveis intermédios: Coração, pulmão e vasos sanguíneos.</p> <p>Níveis baixos: Outras regiões do cérebro.</p> | <p>Níveis elevados: Ceco, cólon e bexiga.</p> <p>Níveis intermédios: Pulmão, vasos sanguíneos, olho e mastócitos.</p> <p>Níveis baixos: Tecido adiposo, glândula adrenal, cérebro, rim, fígado, ovário e glândula pituitária.</p> | <p>Níveis elevados: Testículo (rato) e mastócitos (rato).</p> <p>Níveis intermédios: Cerebelo (humano?), hipocampo (humano?), pulmão, baço (ovelha) e glândula pineal.</p> <p>Níveis baixos: Tiróide, maioria do cérebro, glândula adrenal, baço (humano), fígado, rim, coração, intestino e testículos (humano).</p> |
| Funções (exemplos) | Bradicardia, inibição da lipólise, redução da filtração glomerular, redução da actividade simpática e parasimpática, inibição pré-sináptica, hiperpolarização neuronal. | Inibição da agregação de plaquetas, vasodilatação, protecção contra danos provocados pela isquémia, estimulação da actividade do nervo sensorial. | Inibição da função dos monócitos e macrófagos, estimulação da libertação de mediadores de mastócitos. | Aumento da libertação de mediadores pelos mastócitos (só em algumas espécies). |

Esta tabela foi modificada de Fredholm *et al.* 2001.

1.3.3. Papel da adenosina no controlo da homeostasia da glucose e na sensibilidade à insulina

A adenosina regula inúmeros processos biológicos (Tabela 1.2) contudo, o seu papel no controlo da homeostasia da glucose e na sensibilidade à insulina continua por esclarecer.

1.3.3.1. Adenosina no tecido adiposo

No tecido adiposo a adenosina desempenha várias funções, que incluem a regulação da lipólise (Fredholm *et al.*, 1978). Diversos estudos demonstraram que a adenosina inibe a lipólise e que, o efeito antilipolítico da mesma é mediado por receptores A_1 (Fredholm *et al.*, 1978; Xu *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2001; Schoelch *et al.*, 2004; Dhalla *et al.*, 2007). No estudo realizado por Dong *et al.* (2001) observou-se que a sobreexpressão do receptor de adenosina A_1 no tecido adiposo de ratos diminuía os níveis de ácidos gordos livres no plasma, comprovando o efeito antilipolítico da adenosina. Para além disso, neste mesmo estudo, demonstrou-se através de um teste de tolerância à insulina (ITT) e de um teste de tolerância à glucose, que a sobreexpressão dos receptores A_1 no tecido adiposo previne o desenvolvimento de resistência à insulina induzida por uma dieta rica em lípidos, o que sugere que, os receptores de adenosina A_1 desempenham um papel importante ao nível do controlo da sensibilidade à insulina.

De igual maneira no estudo efectuado por Schoelch *et al.* (2004), no qual se utilizou um agonista dos receptores A_1 , observou-se um decréscimo dos níveis de ácidos gordos livres e glicerol, o que sugere que a adenosina inibe a lipólise. Observou-se neste mesmo estudo, através de um *clamp* hiperinsulinémico-euglicémico, que o tratamento com este agonista dos receptores A_1 melhora a sensibilidade à insulina e a captação de glucose em ratos *Zucker* (modelo genético de obesidade e resistência à insulina, que apresenta uma mutação no receptor da leptina; Srinivasan e Ramarao, 2007).

Mais recentemente, confirmou-se a acção antilipolítica da adenosina, através da utilização de ratos com deleção do receptor A_1 e da utilização do 2-cloroadenosina, um análogo da adenosina (Johansson *et al.*, 2008). Pela incorporação da glucose em lípidos, observou-se que a adenosina via receptores A_1 estimula a lipogénese, sendo para tal necessária a presença da insulina (Johansson *et al.*, 2008). Contudo, foi observado um aumento do peso dos ratos com deleção dos A_1 , o que poderá indicar que outros receptores de adenosina estão envolvidos na regulação da lipólise e da lipogénese ou que, os receptores A_1 , também poderão estar a exercer funções noutros tecidos para além do tecido adiposo que poderão contribuir para o aumento do peso observado. Johansson *et al.* (2008), observaram também que a norepinefrina em adipócitos de ratos controlo incubados exerceu um efeito oposto ao da adenosina, estimulando a lipólise.¹

¹ As catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) actuam nos β_1 -, β_2 - e β_3 -adrenoreceptores estimulando a lipólise, sendo o β_3 -adrenoreceptor o predominante em roedores, enquanto que nos humanos os mais activos são o β_1 - e β_2 -adrenoreceptores. A estimulação da lipólise ocorre através da ligação das catecolaminas às proteínas G_s , que activam a adenilato ciclase, o que aumenta a produção de cAMP. Por sua vez, o cAMP activa a proteína cinase A, o que leva à fosforilação da lipase hormona sensível (HSL), o que aumenta a hidrólise dos triglicéridos em ácidos gordos e glicerol. Por outro lado, em algumas espécies como, por exemplo nos humanos, as catecolaminas também podem actuar nos α_2 -adrenoreceptores, que actuam nas proteínas G_i , inibindo a lipólise (para uma revisão ver Arner, 2005; Langin, 2006).

A adenosina para além de inibir a lipólise no tecido adiposo parece estar também envolvida no transporte de glucose neste tecido. Vários estudos demonstraram que a adenosina estimula o transporte de glucose induzido pela insulina (Kuroda *et al.*, 1987; Steinfelder e Pethö-Schramm, 1990). Estes efeitos estão de acordo com os efeitos da cafeína, uma vez que esta xantina inibe a captação de glucose estimulada pela insulina no tecido adiposo, provavelmente devido a uma menor translocação dos transportadores Glut4 para a membrana plasmática (Akiba *et al.*, 2004).

1.3.3.2. Adenosina no músculo-esquelético

Se no tecido adiposo existe consenso em relação ao facto da adenosina inibir a lipólise, estando assim, associada à sensibilidade à insulina, via receptores A_1 , no músculo-esquelético existe uma grande controvérsia em relação ao papel da adenosina na sensibilidade à insulina.

Vários trabalhos realizados pelo grupo de Newsholme demonstraram que a adenosina, via receptores A_1 , está associada à resistência à insulina (Espinal *et al.*, 1983; Budohoski *et al.*, 1984; Challiss *et al.*, 1984). Budohoski *et al.* (1984) observaram um aumento da sensibilidade à insulina no músculo-esquelético induzido pela 8-fenilteofilina, um antagonista dos receptores A_1 . Por outro lado, quando se administrou este antagonista dos receptores A_1 em ratos Zucker obesos, foi observado uma reversão da resistência à insulina (Challiss *et al.*, 1984). Também em ratos com resistência à insulina induzida pela dieta, a incubação do músculo-esquelético com 8-fenilteofilina promoveu a reversão da resistência à insulina (Budohoski *et al.*, 1984).

No trabalho realizado por Crist *et al.* (1998) demonstrou-se também que a adenosina, via receptores A_1 , está envolvida na resistência à insulina no músculo-esquelético, uma vez que, a administração de BWA1433, um antagonista dos receptores A_1 , reverte a resistência à insulina em ratos Zucker obesos, os quais apresentavam um decréscimo na captação de glucose no músculo-esquelético.

No entanto, vários estudos demonstraram que a adenosina está envolvida na sensibilidade à insulina no músculo-esquelético via receptores A_1 . Han *et al.* (1998), observaram que a adenosina deaminase, enzima que catalisa a degradação da adenosina, e o DPCPX, um antagonista selectivo dos receptores A_1 , diminuíam o transporte de glucose estimulado pela insulina e pelas contracções no músculo-esquelético, provavelmente através da diminuição da translocação dos transportadores Glut4 para a membrana plasmática. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Vergauwen *et al.* (1994), contudo, estes apenas observaram que o DPCPX inibe a captação de glucose quando o músculo foi exposto em simultâneo à insulina e às contracções. De igual maneira, Thong *et al.* (2007) observaram que a activação dos receptores A_1 aumenta o transporte de glucose estimulado pela insulina porém, tal apenas ocorre em concentrações submáximas de insulina. Recentemente, Faulhaber-Walter *et al.* (2011) demonstraram que ratos com deleção do receptor A_1 apresentavam

um decréscimo da sensibilidade à insulina e, através de um *clamp* hiperinsulinémico-euglicémico, observaram também uma redução da tolerância à glucose, o que sugere que os receptores de adenosina A₁ estão envolvidos na homeostasia da glucose e na sensibilidade à insulina. Neste trabalho foi também observado que no músculo-esquelético dos ratos com deleção dos A₁ ocorre uma diminuição da fosforilação da Akt em condições basais e após a administração de insulina, o que pode diminuir a captação de glucose no músculo-esquelético, uma vez que o Akt está envolvido na translocação dos Glut4 para a membrana plasmática.

Apesar da grande maioria dos estudos referirem que os receptores A₁ desempenham um papel ao nível da homeostasia da glucose e da sensibilidade à insulina, no trabalho realizado por Johansson *et al.* (2007) foi observado que os receptores A₁ não desempenhavam um papel significativo ao nível da captação de glucose no músculo-esquelético mas sim, ao nível das ilhas pancreáticas e, assim, estariam envolvidos na secreção da insulina.

Por outro lado, o papel da adenosina na sensibilidade à insulina não parece ser unicamente mediado pelos receptores A₁, uma vez que existem trabalhos que demonstram um papel dos receptores A_{2B} nestes processos (Figler *et al.*, 2011; Johnston-Cox *et al.*, 2012). Figler *et al.* (2011) observaram que a utilização de ATL-801, um antagonista dos A_{2B}, aumenta a captação de glucose no músculo-esquelético e diminui a produção hepática de glucose. Foi também observado que a activação dos receptores A_{2B} está relacionada com a produção de interleucina-6 (IL-6) nos macrófagos e em células endoteliais (Figler *et al.*, 2011). A IL-6 é um mediador pro-inflamatório que está associado à resistência à insulina. Deste modo, com este trabalho, demonstrou-se que a adenosina, via receptores A_{2B}, está envolvida na resistência à insulina. Por outro lado, num estudo realizado em ratos submetidos a uma dieta rica em lípidos, observou-se que, a posterior utilização de um agonista dos receptores A_{2B} durante 4 semanas, aumentou o metabolismo da glucose e a sensibilidade à insulina, bem como, diminuiu a gordura, o peso e a IL-6 (Johnston-Cox *et al.*, 2012). Assim, ao contrário do demonstrado no estudo anterior, os receptores A_{2B} exercem um efeito protector em ratos com resistência à insulina induzida pela dieta rica em lípidos (Johnston-Cox *et al.*, 2012). Neste trabalho de Johnston-Cox *et al.* (2012) também se observou um decréscimo da fosforilação do Akt no músculo-esquelético, tecido adiposo e fígado de ratos com deleção dos A_{2B} e, observou-se também uma diminuição do IRS2, o que pode contribuir para a resistência à insulina. Foi também observado que a deleção dos receptores A_{2B} leva ao aumento da secreção de insulina nas ilhas pancreáticas isoladas (Johnston-Cox *et al.*, 2012).

1.3.3.3. Adenosina no fígado

No fígado, encontram-se presentes, os quatro subtipos de receptores de adenosina uma vez que foi demonstrada a presença do seu mRNA (Dixon *et al.*, 1996). Vários estudos demonstraram que os

efeitos da adenosina no fígado são mediados pelos receptores A_2 (Buxton *et al.*, 1987; Bartrons *et al.*, 1989). Buxton *et al.* (1987) observaram que a perfusão do fígado com adenosina estimula a glicogenólise, sendo este um efeito mediado pelos receptores A_2 , uma vez que se observou um aumento dos níveis de cAMP. Bartrons *et al.* (1989) demonstraram também que a incubação de hepatócitos de rato com 2-cloroadenosina, estimula a gluconeogénese, efeito também mediado pelos receptores A_2 , uma vez que se observou um aumento do cAMP. Em conformidade com estes estudos, foi posteriormente sugerido que a adenosina via receptores A_{2B} estaria envolvida na resistência à insulina, uma vez que em culturas de hepatócitos de rato, incubadas com diferentes agonistas dos receptores de adenosina, se observou que o estímulo da formação de cAMP e, consequentemente, a glicogenólise e a gluconeogénese, ocorre através do receptor A_{2B} (Yasuda *et al.*, 2003).

1.4. Objectivos

A diabetes do tipo 2 é um grave problema de saúde pública que está associada a mudanças no estilo de vida. Tendo em conta que o consumo crónico de cafeína (antagonista não selectivo dos receptores de adenosina) diminui o risco de diabetes do tipo 2 e que, pelo contrário, a administração aguda de cafeína está associada a um aumento da resistência à insulina, o objectivo geral deste trabalho é esclarecer os efeitos da administração aguda e crónica de cafeína na sensibilidade à insulina e, desvendar qual(is) o(s) receptor(es) de adenosina envolvidos neste efeito.

Os objectivos específicos deste trabalho são:

1. Realizar uma curva dose-resposta para a administração aguda de cafeína, de modo a investigar o mecanismo de acção celular da cafeína na sensibilidade à insulina.
2. Investigar quais os receptores de adenosina envolvidos no efeito da administração aguda e crónica de cafeína na sensibilidade à insulina.
3. Avaliar se o efeito da administração aguda de cafeína e da administração crónica dos diferentes antagonistas dos receptores de adenosina é devido a uma alteração da expressão dos Glut4 e /ou mediado pela activação da AMPK no músculo-esquelético.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

As experiências foram realizadas em ratos *Wistar* de ambos os sexos com idade compreendida entre 9 a 12 semanas (200-380g), adquiridos no Biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCM-UNL). Os animais foram mantidos com controlo de temperatura e humidade ($21 \pm 1^\circ\text{C}$; $55 \pm 10\%$ humidade), com ciclos de 12h luz – 12h escuridão. Na véspera do protocolo experimental os animais foram submetidos a um jejum nocturno (> 8 horas), com livre acesso à água ou à cafeína. Posteriormente, foram anestesiados com pentobarbital sódico 60 mg/kg e transferidos para uma manta de aquecimento, com o objectivo de manter a temperatura corporal a $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante o decorrer do procedimento experimental. A monitorização da temperatura rectal foi efectuada através de uma sonda rectal.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com a directiva da União Europeia, “*European Union Directive for Protection of Vertebrates Used for Experimental and Other Scientific Ends*” (2010/63/EU) e foram previamente aprovados pelo Comité de Ética da FCM-UNL.

2.1.1. Estudo do efeito da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina

Para determinar o efeito da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina e, investigar se este efeito é mediado por receptores de adenosina foram utilizados ratos *Wistar* alimentados com uma dieta controlo (7,4% lípidos + 75% hidratos de carbono (4% açúcar) + 17% proteína; SDS diets RM1; Probiológica, Sintra, Portugal) e água *al libitum*. Os animais foram submetidos à administração intravenosa na veia femoral de diferentes doses de cafeína (0,001-5 μM), 15 minutos antes da avaliação da sensibilidade à insulina, através do teste de tolerância à insulina (ITT).

De forma a estudar qual(ais) o(s) subtipo(s) de receptor de adenosina envolvidos no efeito da cafeína na sensibilidade à insulina, foram administrados intravenosamente, na veia femoral, antagonistas selectivos dos diferentes subtipos de receptores de adenosina: 8-*cycle*-1,3-*dipropylxanthine* (DPCPX, antagonista A_1 , 0,0005-5 μM ; *Sigma*, Madrid, Espanha), 2-(2-*Furanyl*)-7-(2-*phenylethyl*)-7H-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-5-amine (SCH58261, antagonista A_{2A} 0,0005-0,5 μM ; *Tocris Bioscience*, Reino Unido) e 8-(4-[[4-cyanophenyl]carbamoylemethyl]-oxy)phenyl)-1,3-di(*n*-propyl)xanthine (MRS1754, antagonista A_{2B} 0,001-5 μM ; *Sigma*, Madrid, Espanha), 15 minutos antes da avaliação da sensibilidade à insulina. Uma vez que o DPCPX, SCH58261 e MRS1754 são insolúveis em água, estes foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO; *Baker Analyzed Reagent*, Holanda). Assim, de forma a averiguar se este composto interfere com a

sensibilidade à insulina, foram administradas intravenosamente na veia femoral diferentes diluições de DMSO (1:1000, 1:10000, 1:50000), tendo sido posteriormente analisada a sensibilidade à insulina.

2.1.2. Estudo do efeito da administração crónica de cafeína na sensibilidade à insulina

De modo a avaliar os efeitos de administração crónica de cafeína na sensibilidade à insulina, os ratos foram divididos em 6 grupos: (1) grupo controlo; (2) grupo com cafeína (Caf); (3) grupo com uma dieta rica em lípidos (HF), um modelo obeso de resistência à insulina e hipertensão; (4) grupo com uma dieta rica em lípidos combinada com cafeína (HFCaf); (5) grupo com uma dieta rica em sacarose (HSu), um modelo magro que combina a resistência à insulina e a hipertensão; (6) grupo com uma dieta rica em sacarose combinada com cafeína (HSuCaf) (Conde *et al*, 2012).

O grupo controlo foi obtido como referido anteriormente (ver 2.1.1); o grupo HF foi submetido a uma dieta sólida rica em lípidos (45% lípidos + 35% hidratos de carbono + 20% proteína; *Mucedola, Settimo Milanese*, Itália) durante 21 dias; o grupo HSu foi obtido através da administração de 35% de sacarose (GPR Rectapur, Bélgica) na água durante 28 dias. A cafeína (1g/l) foi administrada na água durante os últimos 15 dias do protocolo experimental. No grupo HSuCaf, a sacarose e a cafeína foram administradas no mesmo recipiente (Conde *et al*, 2012).

Para estudar qual(ais) o(s) subtipo(s) de receptores de adenosina envolvidos no efeito da ingestão crónica da cafeína na sensibilidade à insulina, foram administrados diariamente durante 15 dias ao grupo controlo e ao grupo HSu, intraperitonealmente os seguintes antagonistas dos receptores de adenosina: DPCPX (0,4mg/kg), SCH58261 (0,5mg/kg) e MRS1754 (9,5µg/kg). Tal como foi dito anteriormente, estes compostos apenas são solúveis em DMSO, assim de maneira a descartar possíveis efeitos do veículo na sensibilidade à insulina o grupo controlo e HSu foram submetidos nos últimos 15 dias de dieta à administração intraperitoneal (i.p.) de DMSO (duas partes de DMSO para uma de soro fisiológico).

2.2. Teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à insulina foi utilizado para determinar a sensibilidade à insulina. Este teste consiste na administração de um bólus intravenoso de insulina de 0,1U/kg de peso, após um jejum nocturno (> 8 horas), seguida da medição do declínio da concentração de glucose no plasma durante 15 minutos, com intervalos de 1 minuto (Conde *et al*, 2012). A constante de diminuição da glicémia (K_{ITT}) foi determinada através da fórmula, $0,693/t_{1/2}$. A semi-vida da glucose ($t_{1/2}$) foi calculada pela variação da concentração plasmática de glucose, durante a fase de decréscimo linear, pelo método dos mínimos quadrados. As amostras de sangue foram recolhidas utilizando o método de excisão da

porção distal da cauda do rato e, a glicémia foi quantificada através de um analisador de glicémia (*Precision Xceed, Abbott Diabetes Care, Portugal*).

2.3. Medição da pressão arterial média

Para determinar a pressão arterial média (PAM) colocou-se um cateter na artéria femoral, estando este ligado a um transdutor de pressão (modelo 603, *HSE-HA GmgH, Harvard Apparatus, Madrid, Espanha*) e a um amplificador de pressão (*Plugsys Housings, modelo 603, HSE-HA GmgH, Harvard Apparatus, Madrid, Espanha*). A pressão arterial média foi adquirida através do *software HSE-Harvard Pulmodyn W (Harvard Apparatus, Madrid, Espanha)*.

2.4. Quantificação da insulina no plasma

Após a medição da sensibilidade à insulina realizou-se uma punção cardíaca para recolha de plasma e soro, para tubos revestidos com EDTA e eppendorfs, respectivamente. As amostras de plasma foram centrifugadas (*Sigma, Madrid, Espanha*) a 3000g durante 10 minutos (4°C) e, as amostras de soro foram centrifugadas (*Eppendorf, Madrid, Espanha*) a 13000g durante 10 minutos (4°C).

A insulinémia foi quantificada no plasma através de um kit de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Mercodia Ultrasensitive Rat insulin ELISA kit, Mercodia AB, Uppsala, Suécia)*.

2.5. Quantificação das catecolaminas no plasma

Para quantificação das catecolaminas, 500µl de plasma foi purificado e as catecolaminas foram extraídas utilizando cartuchos de extracção sólido-líquido 30mg de *OASIS Hlb Wat (Waters, Waltham, MA, EUA)* e, eluídas em 500µl de fase móvel. Uma quantidade de 100µl de amostra foi directamente injectada num sistema de cromatografia líquida de alta eficiência composto por uma bomba *Waters 600*, uma coluna *Waters C18* (4µm de tamanho de partículas), um injector automático *Waters 717* e um detector electroquímico *Bioanalytical Systems LC-4A*. Uma eluição isocrática foi utilizada: a fase móvel consistiu numa solução de Na_2HPO_4 (25mM) com 6% de metanol (pH 3,55), com um fluxo de 1,0ml/min. A aquisição de dados e a sua análise foi efectuada através do *Peak Sample Chromatography System Software (Buck Scientific, East Norwalk, CT, USA)*. A identificação e quantificação das catecolaminas foram realizadas através de referências.

2.6. Recolha de tecidos

O músculo-esquelético foi recolhido e criopreservado a -80°C, para posterior estudo da expressão proteica da AMPKα1, transportadores Glut4 e receptores da adenosina, A₁, A_{2A} e A_{2B}. Também o cérebro foi recolhido e criopreservado a -80 C, para posterior estudo da expressão

proteica do receptor de adenosina A_{2A}. Foram também removidas e, posteriormente, pesadas, a gordura visceral, renal e genital (*Mettler Toledo*, Lisboa, Portugal).

2.7. Análise por western blot da expressão proteica dos receptores de adenosina, transportadores Glut4, AMPK α 1 e actividade da AMPK α 1 através da fosforilação da AMPK α 1 Thr¹⁷²

Amostras de músculo-esquelético e o cérebro (50mg) foram homogeneizadas em meio Zurich (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; NaCl 150mM; Triton X-100 1%; Colato de sódio 1%; SDS 1%) com um cocktail de inibidores de proteases (tripsina, pepstatina, leupeptina, aprotinina ortovanadato de sódio, PMSF) e, centrifugados (*Eppendorf*, Madrid, Espanha) a 13000g durante 20 minutos. De seguida, procedeu-se à recolha do sobrenadante, tendo este sido congelado a -80°C até posterior utilização. A concentração da proteína dos homogeneizados foi determinada através de um método colorimétrico *Micro-BCA* (*Pierce*, Madrid, Espanha). Amostras dos homogeneizados (50µg) e de marcadores de peso molecular conhecido (*Precision*, *Biorad*, Madrid, Espanha) foram separadas por SDS-PAGE (10%) em condições redutoras.

2.7.1. Análise por western blot de 2 passos da expressão proteica dos transportadores Glut4, AMPK α 1 e actividade da AMPK α 1 através da fosforilação da AMPK α 1 Thr¹⁷² no músculo-esquelético

Após a separação das amostras por SDS-PAGE, estas foram electrotransferidas para membranas de difluorido polivinilideno (0,45µM, *Millipore*, Espanha). De seguida, procedeu-se ao bloqueio da ligação não específica durante 1 hora à temperatura ambiente com uma solução de leite em pó 5% em tampão Tris salino, pH 7,6 (TBS), contendo *Tween* 20 (TTBS 0,1%) (*BioRad*, Espanha). As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo primário policlonal cabra anti-Glut4 (1:200) (*Sta Cruz Biotechnology*, EUA), policlonal cabra anti-AMPK (1:200) (*Sta Cruz Biotechnology*, EUA) e policlonal coelho anti-AMPK α 1 Thr¹⁷² fosforilada (1:200) (*Sta Cruz Biotechnology*, EUA). Após 3 lavagens de 15 minutos com TTBS (0,1%), as membranas foram incubadas durante 90 minutos com o anticorpo secundário macaco anti-cabra (1:5000) (*Sta Cruz Biotechnology*, EUA) e cabra anti-coelho (1:5000) (*Sta Cruz Biotechnology*, EUA) à temperatura ambiente. Após a lavagem do anticorpo secundário, as membranas foram incubadas com reagente de quimioluminescência (*Immobilon western*, *Millipore*, Espanha) para a detecção da proteína de interesse. A intensidade do sinal foi detectada no *Chemidoc Molecular Imager* (*Chemidoc BioRad*, Espanha). De seguida, procedeu-se à lavagem das membranas e, posterior incubação durante 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo monoclonal rato anti-GAPDH (1:250) (*Sta Cruz Biotechnology*, EUA). Após 3 lavagens de 15 minutos com TTBS (0,1%), as membranas foram

incubadas durante 90 minutos com o anticorpo secundário cabra anti-rato (1:2000) (*Sta Cruz Biotechnology*, EUA). Esta incubação para o GAPDH permitiu comparar e normalizar a expressão das proteínas em relação à proteína de referência, o GAPDH. A intensidade média das amostras controlo em cada membrana foi utilizada como referência para controlar as variações inter gel.

2.7.2. Análise por *western blot* de 3 passos da expressão proteica dos receptores de adenosina no músculo-esquelético e no cérebro

Após a separação das amostras por SDS-PAGE, estas foram electrotransferidas para membranas de nitrocelulose (0,2µM, *BioRad*, Espanha). De seguida, as membranas foram incubadas durante 5 minutos numa solução de vermelho de *Ponceau S* (0,1%) em ácido acético e lavadas com água Mili-Q. Posteriormente foram guardadas a 4°C durante a noite. Após o bloqueio da ligação não específica por 1 hora à temperatura ambiente com uma solução de *I-Block* 0,5% (*Applied Biosystems*, EUA) em TTBS (0,02%), as membranas foram incubadas durante duas horas com o anticorpo primário monoclonal rato anti-A_{2A} (1:200) (*Sta Cruz Biotechnology*, EUA). Seguidamente, procedeu-se a 4 lavagens de 15 minutos com TTBS (0,02%). As membranas foram incubadas durante 90 minutos com o anticorpo secundário conjugado com biotina anti-rato (1:10000) (*Millipore*, Espanha). Após a lavagem do anticorpo secundário, as membranas foram incubadas durante 30 minutos com o anticorpo terciário conjugado com streptavidina (1:10000) (*Pierce*, EUA). De seguida, procedeu-se à lavagem das membranas com TTBS. A detecção da proteína de interesse foi efectuada como descrito anteriormente (ver 2.6.1.). Por último, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal rato anti- α -tubulina (1:200) (*Sta Cruz Biotechnology*, EUA) (proteína de referência), para posterior normalização. Depois de 4 lavagens de 15 minutos com TTBS (0,02%), as membranas foram incubadas durante 90 minutos com o anticorpo secundário conjugado à biotina anti-rato (1:10000) (*Millipore*, Espanha). Após a lavagem do anticorpo secundário, as membranas foram incubadas com o anticorpo terciário conjugado com streptavidina (1:10000) (*Pierce*, EUA), como descrito previamente.

2.8. Fármacos e químicos

A aprotinina, cafeína, colato de sódio, EDTA, leupeptina, NaCl, ortovanadato de sódio, pepstatina, PMSF, Ponceau S, tripsina, Tris, Triton X-100 foram obtidas na *Sigma-Aldrich* (Madrid, Espanha). A insulina está comercialmente disponível como *Humulin® Regular* (*Lilly*, Portugal) numa concentração de 100UI/ml.

2.9. Análise de dados

Os dados foram analisados utilizando o *Graph Pad Prism Software*, versão 5 (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA*) e apresentados com média \pm SEM. A significância das diferenças entre as médias foi calculada através do *One e Two-Way Analysis of Variance* (ANOVA) com os testes de comparação múltipla *Bonferroni* e *Dunnett* e, *Bonferroni*, respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Efeitos da administração aguda dos antagonistas dos receptores de adenosina

Sabendo que a administração aguda de cafeína está associada ao aumento da resistência à insulina, neste trabalho pretendeu-se averiguar se este efeito é mediado pelos receptores de adenosina. Neste sentido, foi administrada de forma aguda diferentes antagonistas dos receptores de adenosina.

3.1.1. Efeito da administração aguda de cafeína, DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na pressão arterial média

A figura 3.1 representa os efeitos da administração dos diferentes antagonistas dos receptores de adenosina, utilizados neste trabalho, na pressão arterial média (PAM). Como se pode observar, a administração aguda de diferentes concentrações de cafeína, DPCPX, SCH58261 e MRS1754 não modificou significativamente a PAM. É ainda de referir que a administração de diferentes diluições de DMSO (1:1000, 1:10000, 1:50000) não modificou a PAM (resultados não apresentados), tal como descrito na literatura (Camp *et al.*, 1981; James *et al.*, 1982).

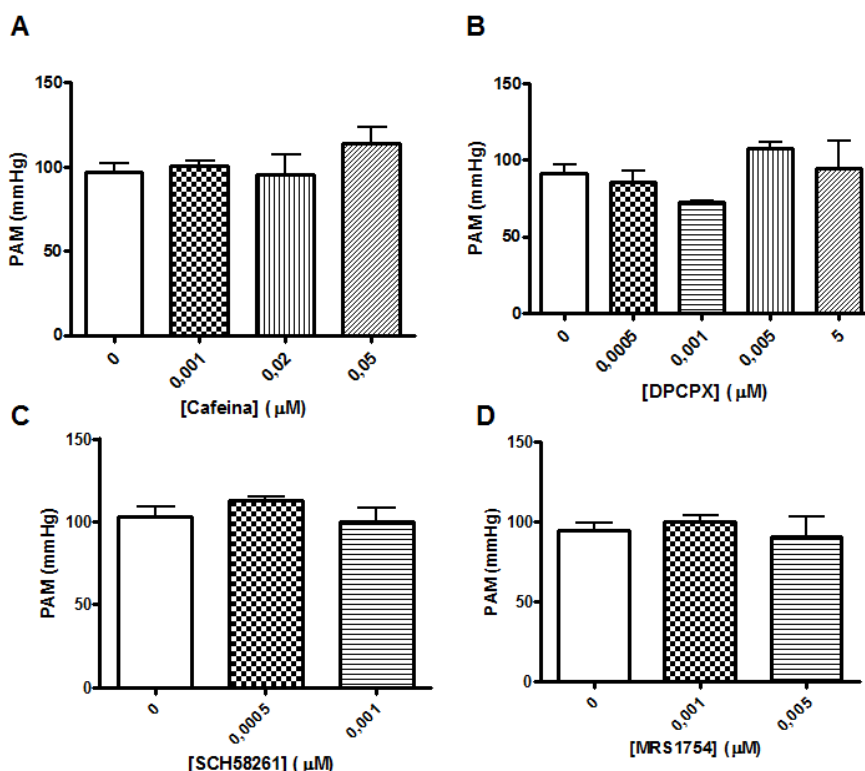


Figura 3.1. Efeito da administração aguda de A) cafeína (antagonista não selectivo; 0,001-5μM), B) DPCPX (antagonista A₁; 0,0005-5 μM), C) SCH58261 (antagonista A_{2A}; 0,0005-0,5 μM) e D) MRS1754 (antagonista A_{2B}; 0,001-5 μM) na pressão arterial média (PAM). As barras verticais representam a média ± SEM.

3.1.2. Efeito da administração aguda de cafeína, DMSO, DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na glicémia basal

O efeito da administração aguda de cafeína está representado na figura 3.2, na qual se pode observar que a administração aguda de cafeína não modificou significativamente a glicémia basal. Quanto ao efeito de diferentes diluições de DMSO e diferentes concentrações de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na glicémia basal, este está representado na figura 3.3. A administração dos antagonistas selectivos dos diferentes receptores de adenosina testados e do DMSO não altera a glicémia basal.

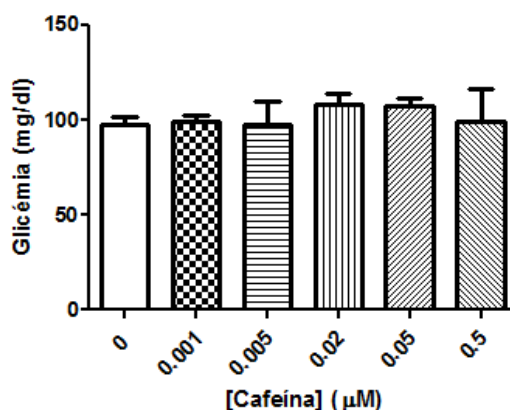


Figura 3.2. Efeito da administração aguda de diferentes concentrações de cafeína (antagonista não selectivo; 0,001-5 μM) na glicémia basal. As barras verticais representam a média ± SEM.

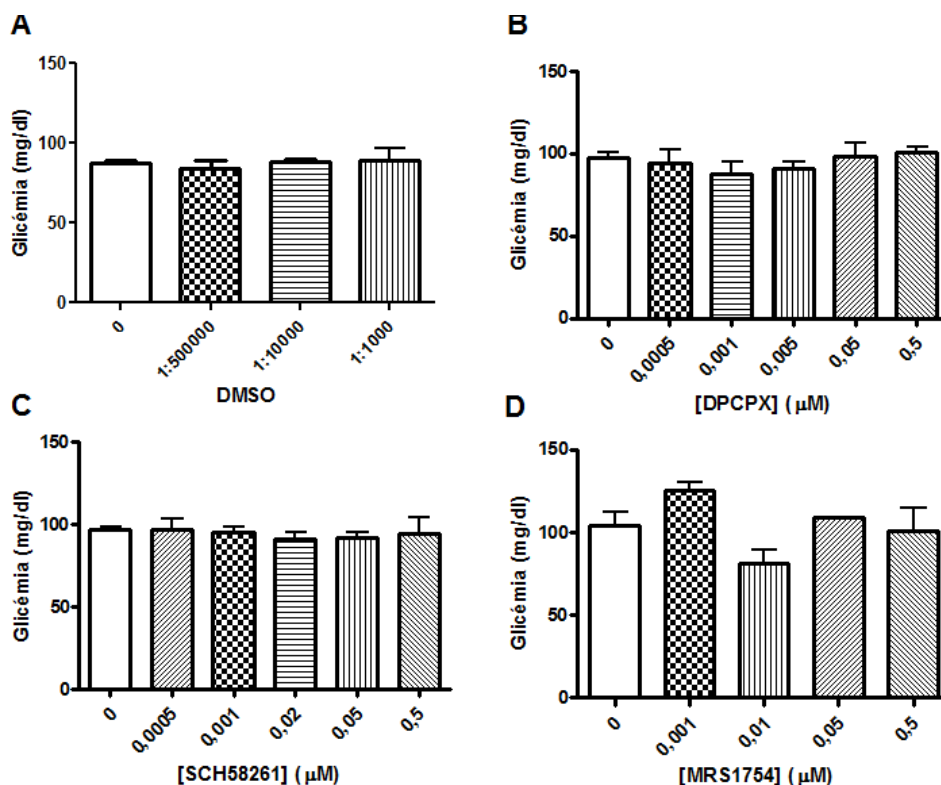


Figura 3.3. Efeito da administração aguda de A) diferentes diluições de DMSO (1:1000, 1:10000, 1:50000) e, diferentes concentrações de B) DPCPX (antagonista A_1 ; 0,0005-5 μM), C) SCH58261 (antagonista A_{2A} ; 0,0005-0,5 μM) e D) MRS1754 (antagonista A_{2B} ; 0,001-5 μM) na glicémia basal. As diluições de DMSO testadas correspondem às diluições utilizadas para a preparação das amostras dos antagonistas dos receptores de adenosina. As barras verticais representam a média ± SEM.

3.1.3. Efeito da administração aguda de cafeína na insulinémia

A figura 3.4 representa o efeito da administração aguda de cafeína nos valores de insulinémia. A insulinémia em jejum nos ratos controlo foi de $2,04 \pm 0,40$ ($\mu\text{g/l}$) (Fig.3.4). A administração aguda de cafeína não modificou significativamente os níveis basais de insulina no plasma para as diferentes concentrações testadas.

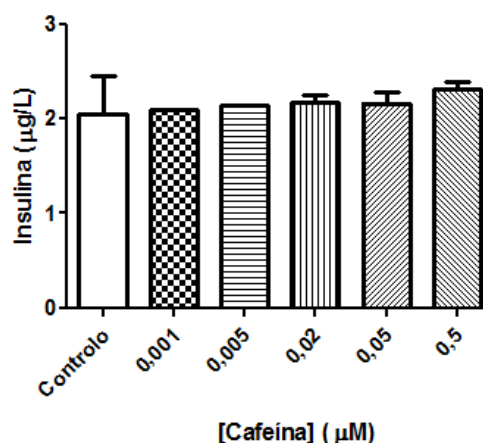


Figura 3.4. Efeito da administração aguda de cafeína (0,001-5 μM) na insulinémia ($n=1 - 8$). As barras verticais representam a média \pm SEM.

3.1.4. Efeito da administração aguda de cafeína e DMSO na sensibilidade à insulina

Na figura 3.5 encontra-se representado o efeito da administração aguda de cafeína e DMSO na sensibilidade à insulina. Como se pode observar, a administração aguda de cafeína (0,001-5 μM) diminui a sensibilidade à insulina de uma maneira dependente da dose. Relativamente ao efeito máximo da administração de cafeína, este foi de 59,97% e, a concentração de antagonista necessária para reduzir o efeito máximo em 50% (IC_{50}), foi 11,91nM.

Quanto ao efeito do DMSO, pode-se observar que este não modificou significativamente a sensibilidade à insulina em nenhuma das diluições testadas (1:1000, 1:10000 e 1:50000) (Fig.3.5).

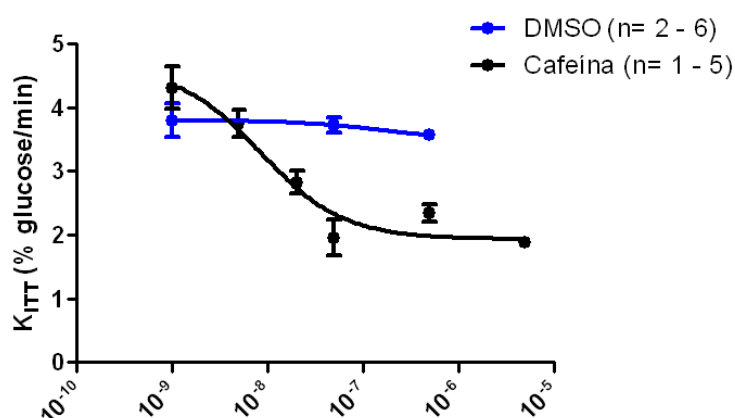


Figura 3.5. Efeito da administração aguda de diferentes concentrações de cafeína (0,001-5 μM) e diferentes diluições de DMSO (1:1000, 1:10000 e 1:50000) na sensibilidade à insulina. As diluições de DMSO testadas correspondem às diluições utilizadas para a preparação das amostras dos antagonistas dos receptores de adenosina. As barras verticais representam a média \pm SEM.

3.1.5. Efeito da administração aguda de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na sensibilidade à insulina

A figura 3.6 representa o efeito da administração aguda de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na sensibilidade à insulina. No caso do SCH58261, um antagonista dos receptores de adenosina A_{2A} , este não alterou significativamente a sensibilidade à insulina para as diferentes concentrações testadas (Fig.3.6 A). Por sua vez, o DPCPX, um antagonista dos receptores A_1 e o MRS1754, um antagonista dos A_{2B} , diminuíram a sensibilidade à insulina de uma maneira depende da dose (Fig.3.6 B).

Relativamente ao efeito máximo da administração de DPCPX e MRS1754, este foi semelhante ao da cafeína (Tabela 3.1). Em relação à concentração de antagonista necessária para reduzir o efeito máximo em 50% (IC_{50}), observou-se que a cafeína apresenta um menor IC_{50} , seguida do DPCPX e do MRS1754 (Tabela 3.1).

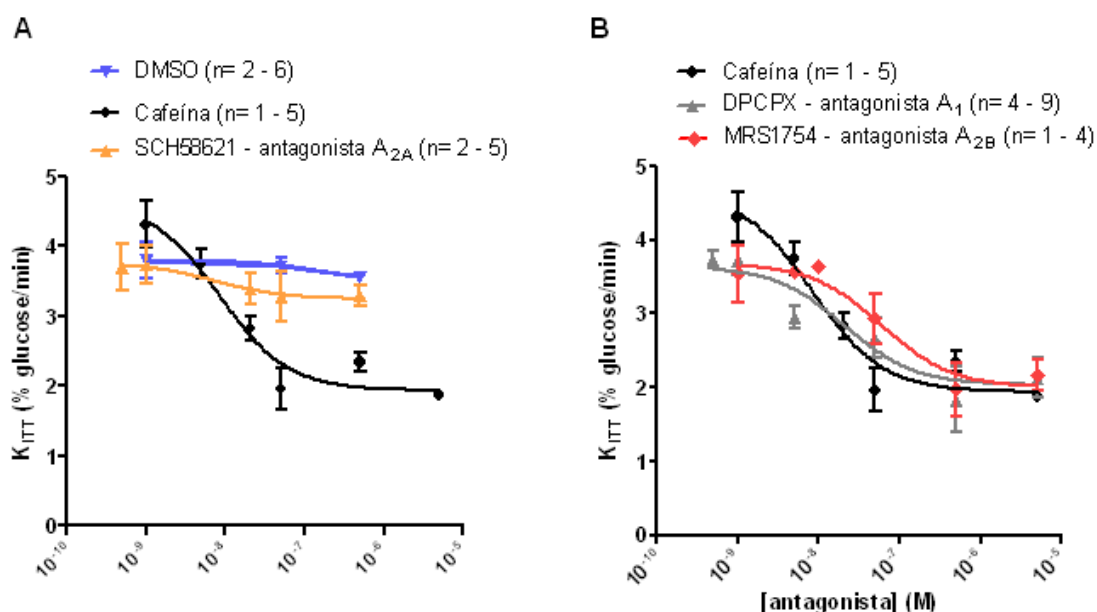


Figura 3.6. Efeito da administração aguda de diferentes A) diluições de DMSO (1:1000, 1:10000 e 1:50000) e diferentes concentrações de cafeína (antagonista não selectivo, 0,001-5 μ M), SCH58261 (antagonista A_{2A} , 0,0005-0,5 μ M), B) DPCPX (antagonista A_1 , 0,0005-5 μ M) e MRS1754 (antagonista A_{2B} , 0,001-5 μ M) na sensibilidade à insulina. As diluições de DMSO testadas correspondem às diluições utilizadas para a preparação das amostras dos antagonistas dos receptores de adenosina. As barras verticais representam a média \pm SEM.

Tabela 3.1. Efeito máximo e IC_{50} da administração aguda de cafeína, DPCPX e MRS1754.

| | Cafeína | DPCPX | MRS1754 |
|----------------|---------|-------|---------|
| E_{max} (%) | 59,97 | 57,66 | 58,05 |
| IC_{50} (nM) | 11,91 | 21,48 | 43,05 |

3.1.6. Efeito da administração aguda de cafeína na expressão de AMPK α 1 e Glut4 no músculo-esquelético

Na figura 3.7.A e B estão representados os *Western Blots* que comparam a expressão de AMPK α 1 e Glut4 no músculo-esquelético, que correspondem às bandas 63KDa e 54KDa, respectivamente, para as diferentes doses de cafeína (0,001-0,5 μ M) administradas de forma aguda. Como se observa na figura 3.7C, a cafeína não modificou a expressão da AMPK α 1 no músculo-esquelético. Relativamente aos transportadores Glut4 no mesmo tecido, observou-se um decréscimo da sua expressão em 34,98%, para uma concentração de 0,5 μ M de cafeína (Fig.3.7D).

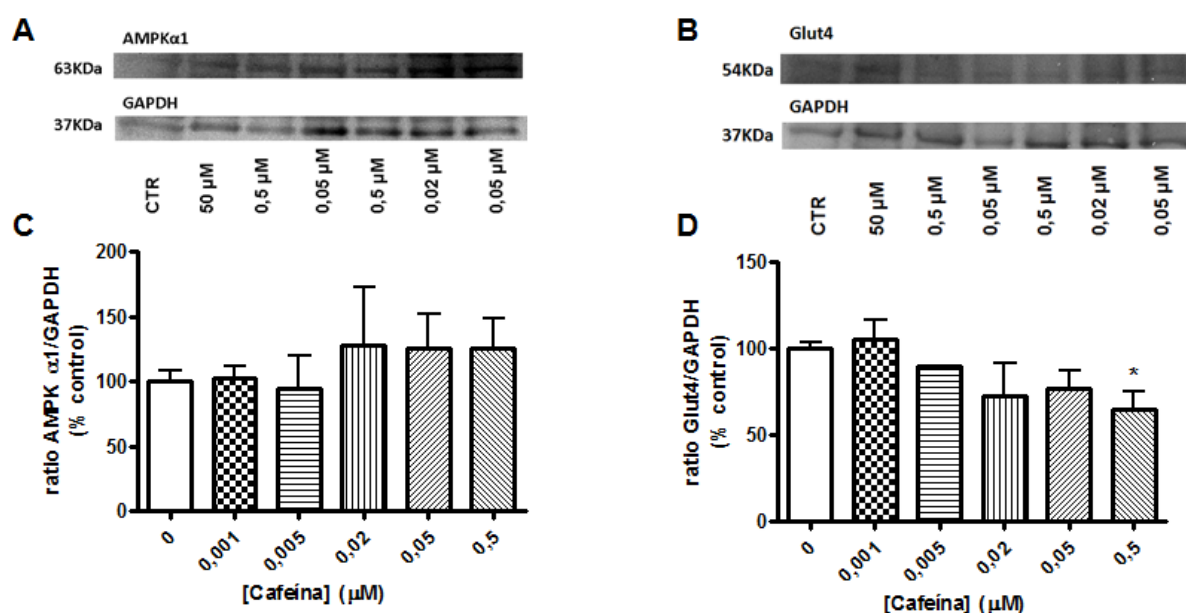


Figura 3.7. Efeito da administração aguda de cafeína na expressão de AMPK α 1 e de Glut4 no músculo-esquelético. A e B) imagens representativas de *Western blots* que comparam a expressão de AMPK α 1 (63kDa) e Glut4 (54kDa) no músculo-esquelético na ausência de cafeína e após a administração de diferentes concentrações de cafeína (0,001-0,5 μ M); C e D) mostram respectivamente, valores médios da expressão de AMPK α 1 (n=2 - 9) e Glut4 (n=1 - 9) em relação à expressão do GAPDH. *p<0.05 compara todos os valores com os valores controlo, ou seja, sem cafeína (One-way ANOVA com teste de comparação múltipla Dunnett). As barras verticais representam a média \pm SEM.

3.1.7. Efeito da administração aguda de cafeína nas catecolaminas do plasma

Resultados preliminares do efeito da administração aguda de cafeína nas catecolaminas circulantes indicam que a cafeína aumenta os níveis de epinefrina e norepinefrina. Estes resultados permitem ainda depreender que os níveis de epinefrina no plasma são superiores aos da norepinefrina, o que sugere uma acção da cafeína ao nível da medula adrenal.

3.2. Efeitos da administração crónica dos antagonistas dos receptores de adenosina

Sabendo que a administração crónica de cafeína reverte a resistência à insulina, neste trabalho pretendeu-se averiguar se este efeito é mediado pelos receptores de adenosina. Neste sentido, foi

administrada de forma crónica diferentes antagonistas dos receptores de adenosina e, estudado o seu efeito em ratos controlo e em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose que induz resistência à insulina e hipertensão.

3.2.1. Efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na pressão arterial média

Na figura 3.8 encontra-se representado o efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na pressão arterial média em ratos controlo e em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). Tal como se pode observar, a administração crónica quer de DPCPX quer de SCH58261 não modificou significativamente a PAM no grupo controlo. Contudo, a administração de MRS1754, um antagonista selectivo dos receptores A_{2B} da adenosina diminui significativamente em 32.5% a PAM em comparação com o valor do veículo ($99,02 \pm 9,47\text{mmHg}$). Tal como seria de esperar e, em concordância com resultados previamente obtidos (Conde *et al.*, 2012), a dieta rica em sacarose aumentou significativamente o valor da PAM para $132,90 \pm 4,31\text{mmHg}$. A administração de, DPCPX e de MRS1754 no grupo HSu diminuiu significativamente a PAM para $112,90 \pm 6,65\text{mmHg}$ e $94,96 \pm 5,73\text{mmHg}$, respectivamente.

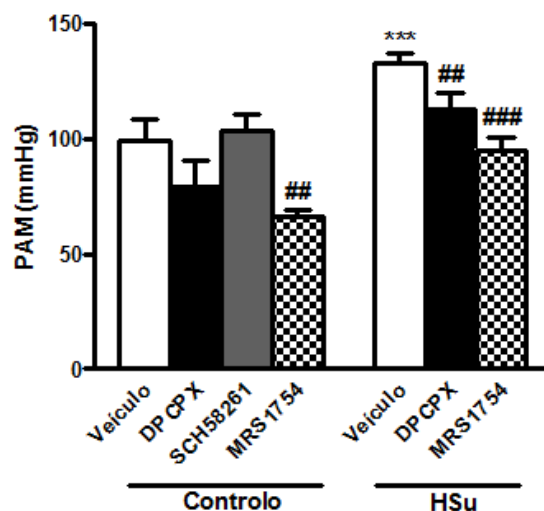


Figura 3.8. Efeito da administração crónica de DPCPX (antagonista A_1 , 0,4mg/kg), SCH58261 (antagonista A_{2A} , 0,5mg/kg) e MRS1754 (antagonista A_{2B} , 9,5µg/kg) na pressão arterial média (PAM) em ratos controlo e em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). *** $p < 0,001$ em comparação com o veículo no grupo controlo (*One-Way ANOVA* com teste de comparação múltipla *Bonferroni*). ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ em comparação com os valores do veículo no respectivo grupo (*Two-Way ANOVA* com teste de comparação múltipla *Bonferroni*). As barras verticais representam a média \pm SEM.

3.2.2. Efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na glicémia basal

O efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na glicémia basal encontra-se representado na figura 3.9. Tal como se pode observar na figura, a administração dos diferentes antagonistas dos receptores de adenosina no grupo controlo não modificou significativamente os

valores de glicémia basal quando comparados com o veículo/controlo (veículo = $90,56 \pm 5,79$ mg/dl; DPCPX = $103,80 \pm 4,35$ mg/dl; SCH58261 = $81,17 \pm 1,91$ mg/dl; MRS1754 = $84,17 \pm 1,82$ mg/dl). Observou-se também que a administração crónica de DMSO em ratos HSu (veículo/HSu) levou a uma diminuição significativa da glicémia basal para valores próximos do veículo/controlo, em comparação com o grupo de ratos apenas submetido à dieta HSu ($145 \pm 9,56$ mg/dl; ver tabela 8.1 em anexo). No grupo HSu, a administração crónica de DPCPX aumentou a glicémia basal para $108,70 \pm 3,5$ mg/dl comparativamente com o grupo veículo/HSu ($90,25 \pm 8,14$ mg/dl). No caso do MRS1754, a administração crónica deste fármaco não modificou significativamente a glicémia basal em relação ao veículo nos animais submetidos a uma dieta rica em sacarose.

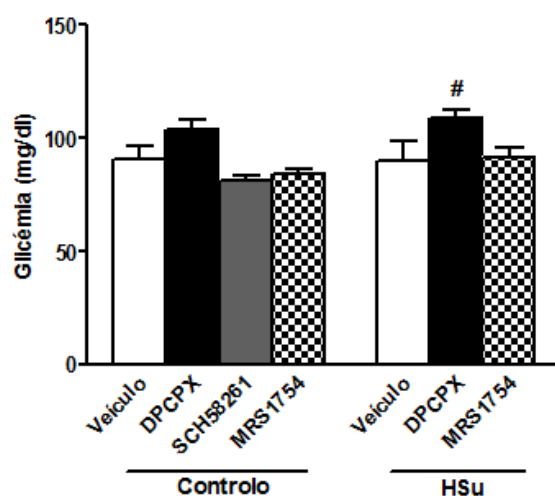


Figura 3.9. Efeito da administração crónica de DPCPX (antagonista A_1 , 0,4mg/kg), SCH58261 (antagonista A_{2A} , 0,5mg/kg) e MRS1754 (antagonista A_{2B} , 9,5μg/kg) na glicémia basal em ratos controlo e em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). # $p < 0,05$ em comparação com os valores do veículo no respectivo grupo (*Two-Way ANOVA* com teste de comparação múltipla *Bonferroni*). As barras verticais representam a média \pm SEM.

3.2.3. Efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na sensibilidade à insulina

Na figura 3.10 encontra-se representado o efeito da administração crónica do DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na sensibilidade à insulina em ratos controlo e em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose. Tal como se pode observar na figura, a administração crónica quer de DPCPX quer de SCH58261, antagonistas dos receptores A_1 e A_{2A} , respectivamente, não modificou a sensibilidade à insulina em animais controlo. A administração crónica de MRS1754, antagonista dos receptores A_{2B} , neste mesmo grupo controlo, diminuiu significativamente a sensibilidade à insulina, uma vez que a constante do ITT, (K_{ITT}) diminuiu para $2,44 \pm 0,19$ %glucose/min em comparação com o veículo ($4,16 \pm 0,28$ %glucose/min). Observou-se também e, tal como previamente descrito (Hulman e Falkner, 1994; Ribeiro *et al.*, 2005; Conde *et al.*, 2012), que dieta HSu também diminuiu a sensibilidade à insulina ($2,34 \pm 0,20$ %glucose/min (veículo/HSu)).

No grupo HSu, observou-se também que a administração crónica de DPCPX, embora apresente uma tendência para aumentar a sensibilidade à insulina, esta não é estatisticamente significativa ($3,13 \pm 0,25$ %glucose/min). A administração crónica de MRS1754 nos ratos submetidos a dieta HSu aumentou significativamente a sensibilidade à insulina para valores próximos do valor controlo ($3,72 \pm 0,32$ %glucose/min).

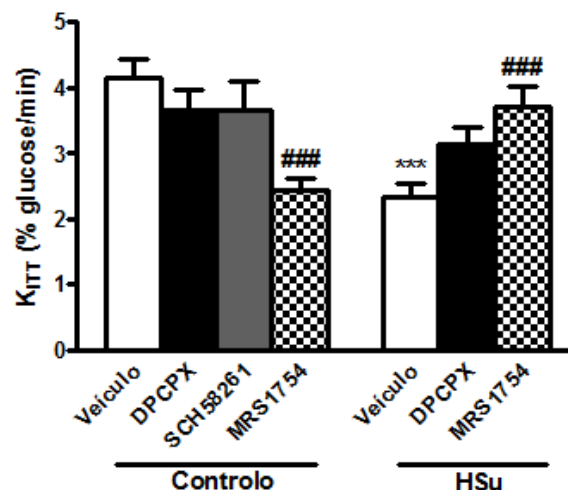


Figura 3.10. Efeito da administração crónica de DPCPX (antagonista A_1 , 0,4mg/kg), SCH58261 (antagonista A_{2A} , 0,5mg/kg) e MRS1754 (antagonista A_{2B} , 9,5µg/kg) na sensibilidade à insulina em ratos controlo e ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). *** $p < 0,001$ em comparação com o veículo no grupo controlo (*One-Way ANOVA* com teste de comparação múltipla *Bonferroni*). ### $p < 0,001$ em comparação com os valores do veículo no respectivo grupo (*Two-Way ANOVA* com teste de comparação múltipla *Bonferroni*). As barras verticais representam a média \pm SEM.

3.2.4. Efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na gordura total e visceral

Dado que a obesidade e, mais precisamente a gordura visceral, parece ser um dos factores que mais contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina, torna-se importante averiguar o efeito da administração crónica dos antagonistas selectivos dos diferentes receptores de adenosina na gordura total e visceral. O efeito da administração crónica de DPCPX, SCH58261 e MRS1754 na gordura total e visceral encontra-se representado na figura 3.11. Tal como se pode observar na figura 3.11^a, a administração crónica dos antagonistas dos diferentes receptores de adenosina não modificou a gordura total em animais controlo, quando comparados com os animais submetidos ao veículo/controlo (veículo = $38,00 \pm 2,58$ g/kg; DPCPX = $34,75 \pm 5,07$ g/kg; SCH58261 = $38,38 \pm 2,72$ g/kg; MRS1754 = $42,30 \pm 3,48$ g/kg). Contudo, a ingestão de uma dieta rica em sacarose levou a um aumento significativo da gordura total para $59,41 \pm 3,64$ g/kg. A administração crónica de DPCPX nos animais HSu diminuiu não significativamente ($48,89 \pm 2,54$ g/kg) a gordura total, no entanto, a administração de MRS1754 provocou um aumento significativo da gordura total para $73,48 \pm 5,06$ g/kg.

Relativamente à gordura visceral, pode-se observar (Fig.3.11 B) que a administração crónica dos diferentes antagonistas dos receptores de adenosina não modificou significativamente a gordura visceral (DPCPX = $5,77 \pm 0,79\text{g/kg}$; SCH58261 = $6,45 \pm 0,46\text{g/kg}$; MRS1754 = $6,28 \pm 0,42\text{g/kg}$) em animais controlo. No entanto, a dieta HSu aumentou significativamente os valores de gordura visceral para $11,03 \pm 0,71\text{g/kg}$, em comparação com o veículo/controlo ($7,09 \pm 0,64\text{g/kg}$). A administração crónica de DPCPX em animais submetidos a dieta HSu reverteu a gordura visceral ($7,05 \pm 0,71\text{g/kg}$) para valores similares ao veículo/controlo. Observou-se também que a administração crónica de MRS1754 não modificou significativamente o valor de gordura visceral nos animais HSu.

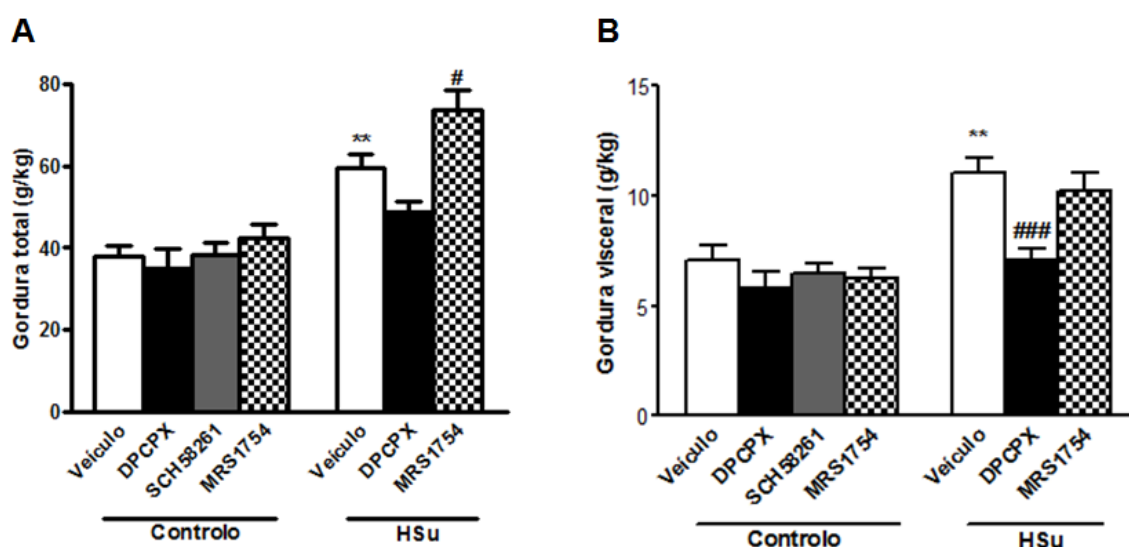


Figura 3.11. Efeito da administração crónica de DPCPX (antagonista A_1 , 0,4mg/kg), SCH58261 (antagonista A_{2A} , 0,5mg/kg) e MRS1754 (antagonista A_{2B} , 9,5 μ g/kg) na A) gordura total e na B) gordura visceral, corrigida para a massa corporal, em ratos controlo e ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). A gordura total corresponde à soma da gordura visceral, renal e genital. **p<0,01 em comparação com o veículo no grupo controlo (One-Way ANOVA com teste de comparação múltipla Bonferroni). ###p<0,001 em comparação com os valores do veículo no respectivo grupo (Two-Way ANOVA com teste de comparação múltipla Bonferroni). As barras verticais representam a média \pm SEM.

3.2.5. Efeito da administração crónica de cafeína na expressão de Glut4, AMPK α 1 e na fosforilação da AMPK α 1 Thr¹⁷² no músculo-esquelético

Tal como foi descrito anteriormente na introdução, a cafeína activa a AMPK (Egawa *et al.*, 2009, 2011) podendo este ser um dos mecanismos que contribui para o seu efeito sensibilizador quando administrada cronicamente. De igual maneira, sabe-se que a adenosina parece exercer alguns efeitos ao nível da captação de glucose (Kuroda *et al.*, 1987; Ferrara e Cushman, 1999). Desta forma, averiguou-se se o efeito da administração crónica de cafeína sobre a sensibilidade à insulina poderia ser mediado por alterações na expressão/actividade da AMPK e/ou expressão dos transportadores Glut4. O efeito da ingestão crónica de cafeína na expressão proteica dos transportadores Glut4 (54kDa) e da AMPK α 1 (63kDa) assim como, da fosforilação da AMPK α 1 Thr¹⁷² (63kDa) no músculo-

esquelético, em ratos controlo, HSu e HF encontra-se representado na figura 3.12. Na figura 3.12 A, B e C pode-se observar *Western blots* representativos da imunorreactividade para os transportadores Glut4, AMPK α 1 e AMPK α 1 Thr¹⁷² fosforilada nas diferentes condições experimentais. Tal como se pode observar na figura 3.12 A e D, a administração de uma dieta rica em sacarose induziu um decréscimo de 59,35% na expressão dos transportadores Glut4, não sendo este efeito alterado com o consumo crónico de cafeína. Relativamente à expressão da AMPK α 1 (Fig.3.12 B e E), observou-se uma diminuição em 70,45% com a dieta HSu e 33,93% com a dieta HF, em comparação com o grupo controlo. No grupo HSu, o consumo crónico de cafeína aumentou em 42,54% a expressão da AMPK α 1 em comparação com o grupo HSu. No caso da dieta HF, o consumo crónico de cafeína reverteu a expressão da AMPK α 1 para valores controlo. Em relação à actividade da AMPK α 1 (Fig.3.12 C e F), medida através da sua fosforilação, observou-se que as ambas as dietas hipercalóricas diminuem a actividade deste enzima, obtendo-se um decréscimo significativo na actividade da AMPK α 1 em animais submetidos a dieta HF (44,74%). Observou-se também que o consumo crónico de cafeína apenas exerceu efeitos na fosforilação da AMPK α 1 no grupo controlo, observando-se um aumento de 29,10% em relação ao grupo sem cafeína, não modificando a actividade da AMPK α 1 nos ratos submetidos a dietas hipercalóricas.

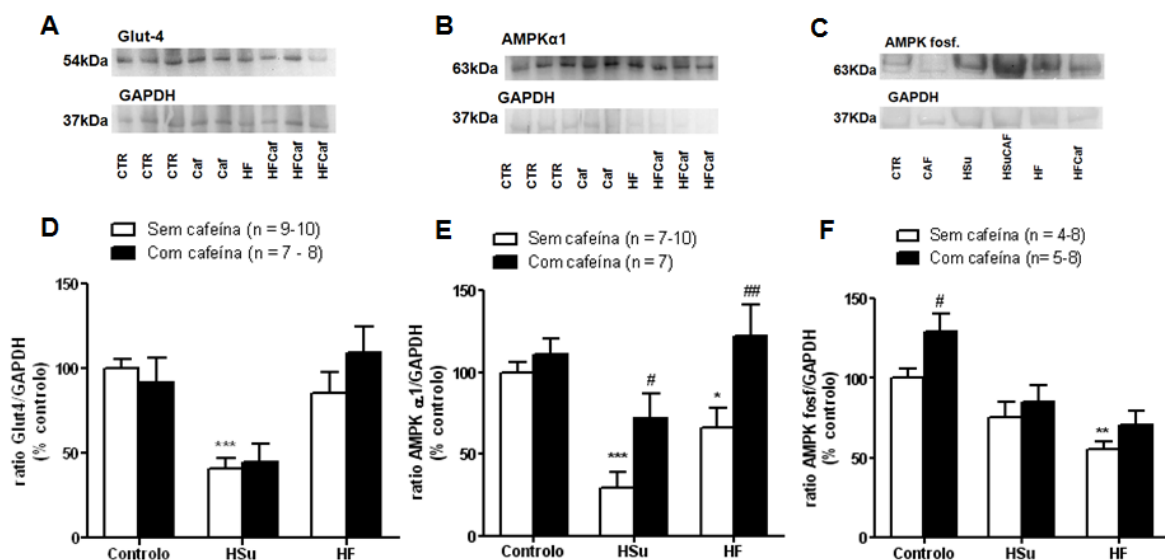


Figura 3.12. Efeito do consumo crónico de cafeína na expressão dos Glut4 e AMPK α 1 e, na fosforilação da AMPK α 1 Thr¹⁷² no músculo-esquelético em ratos controlo e submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu) e rica em lípidos (HF). A, B e C) Western blots que comparam a expressão dos Glut4 (54kDa) e AMPK α 1 (63kDa) e, a fosforilação da AMPK α 1 Thr¹⁷² (63kDa) no músculo-esquelético, em ratos controlo, HSu e HF, com e sem cafeína; D, E e F) mostra respectivamente, a expressão dos Glut4 e AMPK α 1 e, a fosforilação da AMPK α 1 Thr¹⁷² em relação à expressão do GAPDH. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação com os ratos controlo sem administração crónica de cafeína (*One-way ANOVA* com teste de comparação múltipla *Dunnnett*). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ em comparação com os valores sem cafeína no grupo controlo, HSu e HF (*Two-Way ANOVA* com teste de comparação múltipla *Bonferroni*). As barras verticais representam a média \pm SEM.

3.3. Presença dos receptores de adenosina no músculo-esquelético soleus

Dado que o presente trabalho pretende atribuir os efeitos da cafeína aguda e crónica na sensibilidade à insulina a um efeito mediado pelos receptores de adenosina torna-se imperativo demonstrar a sua presença nos tecidos alvo da insulina, nomeadamente no músculo-esquelético, o principal tecido captador de glucose. Começou-se por averiguar a presença dos receptores A_{2A} de adenosina no músculo-esquelético soleus por *Western blot*. Tal como se pode observar na figura 3.13, os receptores A_{2A} estão presentes no músculo-esquelético soleus. Na mesma figura encontra-se também representado o controlo positivo, isto é, a presença destes mesmos receptores no cérebro, um tecido no qual a presença destes receptores já foi demonstrada anteriormente (Mishina *et al*, 2007).

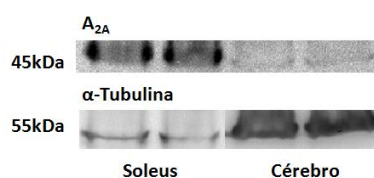


Figura 3.13. Análise por *western blot* da expressão dos receptores de adenosina A_{2A} (45kDa) no músculo-esquelético soleus e no cérebro.

4. Discussão dos Resultados

No presente trabalho demonstrou-se que quer os efeitos da administração aguda quer crónica de cafeína na sensibilidade à insulina são mediados por receptores de adenosina. Confirmou-se ainda, que a administração aguda de cafeína induz resistência à insulina, sendo este efeito mediado pelos receptores de adenosina A_1 e A_{2B} e, envolvendo os transportadores Glut4 no músculo-esquelético e, assim a captação de glucose neste tecido alvo da insulina. Por sua vez, demonstrou-se também que o efeito sensibilizador da cafeína quando consumida de maneira crónica envolve maioritariamente receptores de adenosina A_{2B} , parecendo haver também um efeito dos receptores A_1 ao nível do tecido adiposo. Os resultados do presente trabalho permitiram concluir também, que estes efeitos sensibilizadores da cafeína não parecem ser mediados por alterações na expressão dos transportadores Glut4 e ou expressão/atividade da AMPK.

4.1. Efeitos da administração aguda dos antagonistas dos receptores de adenosina

Relativamente à administração aguda de cafeína, demonstrou-se no presente trabalho, que esta não modificou a pressão arterial média, ao contrário do descrito na literatura no Homem, na qual é observado que a cafeína aguda aumenta a pressão arterial (Robertson *et al.*, 1978; Daniels *et al.*, 1998; Keijzers *et al.*, 2002) e que a adenosina possui um efeito hipotensor (Watt e Routledge, 1985; Belardinelli *et al.*, 1989). Esta discrepância de resultados pode dever-se a diferenças na concentração de cafeína utilizada bem como, no modo de administração da mesma. No trabalho de Robertson *et al.* (1978) e Daniels *et al.* (1998) a cafeína foi ingerida e, como tal, a sua concentração máxima é atingida 60 e 40 minutos após a sua ingestão, respectivamente. No trabalho de Keijzers *et al.* (2002), tal como no presente trabalho, a cafeína foi administrada de forma intravenosa, no entanto, o aumento da PAM foi observado durante o *clamp* hiperinsulinémico-euglicémico e, nesse mesmo trabalho foi observado que a hiperinsulinémia por si só aumentava significativamente a pressão arterial sistólica. Pelo contrário, no presente trabalho, os valores da PAM foram recolhidos após a administração intravenosa de cafeína e, antes do teste de tolerância à insulina, de modo a garantir que o único efeito presente seria o da cafeína. Tal como a cafeína e o DMSO, os diferentes antagonistas testados neste trabalho não alteraram a PAM.

Quanto ao efeito da administração aguda de cafeína na glicémia basal, esta não exerceu qualquer efeito, o que está em concordância com os trabalhos prévios de Petrie *et al.* (2004) e Robinson *et al.* (2004). Similarmente, também a administração aguda das diferentes diluições de DMSO testadas neste trabalho não modificaram os níveis de glucose basal no plasma, ocorrendo o mesmo para os diferentes antagonistas dos receptores de adenosina testados, DPCPX, SCH58261 e

MRS1754. Tal como na glicémia basal, a administração aguda de cafeína não alterou significativamente os níveis de insulina no plasma, estando estes resultados de acordo com o descrito por Petrie *et al.* (2004) e Robinson *et al.* (2004), os quais observaram, antes da realização da prova de tolerância à glucose oral, que a administração aguda de cafeína não modificava a insulinémia.

O efeito da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina foi determinado através de um teste de tolerância à insulina. Ao contrário dos trabalhos realizados no Homem, nos quais apenas foi avaliado o efeito de uma única dose de cafeína na sensibilidade à insulina (Greer *et al.*, 2001; Keijzers *et al.*, 2002; Moisey *et al.*, 2008), neste trabalho foram testadas diferentes concentrações de cafeína (0,001 - 5 μ M), o que permitiu observar que a cafeína diminui a sensibilidade à insulina de uma maneira dependente da dose. De acordo com a curva dose efeito realizada neste trabalho para a acção da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina, pode-se afirmar que se está perante um efeito ao nível dos receptores de adenosina (Fredholm *et al.*, 1999). Deste modo, foram utilizados antagonistas dos receptores de adenosina A₁, A_{2A} e A_{2B}, de forma a avaliar quais os receptores envolvidos neste efeito da cafeína na sensibilidade à insulina. A administração aguda de SCH58261, um antagonista A_{2A}, não alterou significativamente a sensibilidade à insulina para as concentrações testadas (0,0005 - 0,5 μ M), o que indica que os receptores de adenosina A_{2A} não estão envolvidos no efeito da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina. Neste sentido, foi estudado o possível envolvimento dos receptores A₁ e A_{2B}. A administração de DPCPX (0,0005 - 5 μ M), um antagonista dos receptores A₁, e de MRS1754 (0,001 - 5 μ M), um antagonista dos A_{2B}, diminuiu a sensibilidade à insulina de uma maneira depende da dose, o que indica que ambos os receptores estão envolvidos no efeito da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina.

O efeito máximo observado com a administração de DPCPX e MRS1754 foi de 57,66 e 58,05%, respectivamente, sendo estes valores semelhantes ao obtido para a cafeína (59,97%). Pode-se postular que esta semelhança ocorra dado que a partir de uma determinada concentração, os antagonistas selectivos dos diferentes receptores de adenosina como, o DPCPX e o MRS1754, percam a sua selectividade para o receptor em questão. Para o DPCPX, a sua afinidade aos A₁ ocorre numa gama de concentrações entre 0,63 $\times 10^{-9}$ – 39,8 $\times 10^{-9}$ M, sendo o MRS1754 selectivo para os receptores A_{2B} em concentrações na gama dos baixos nanomolar (www.iuphar.org, 2012). Em relação ao IC₅₀, ou seja, à concentração de antagonista necessária para reduzir o efeito máximo em 50%, os valores obtidos foram 21,48 e 43,05nM para o DPCPX e MRS1754, respectivamente, sendo estes valores superiores ao obtido para a cafeína (11,91nM), o que indica que o antagonista mais potente é a cafeína, seguida do DPCPX e por último, do MRS1754.

De modo a investigar o mecanismo pelo qual a administração aguda de cafeína e, portanto, os receptores de adenosina modulam a sensibilidade à insulina, estudou-se o efeito da cafeína na expressão de AMPK α 1 e de Glut4 no músculo-esquelético, uma vez que este é o principal captador de glucose e o primeiro local no qual se desenvolve resistência à insulina. Relativamente à expressão de AMPK α 1 no músculo-esquelético, não foram observadas alterações para as diferentes concentrações de cafeína testadas (0,001 - 0,5 μ M). Contudo, não é possível excluir o envolvimento da AMPK α 1 no mecanismo de acção da cafeína na sensibilidade à insulina, uma vez que neste trabalho não foi determinada a sua actividade, a qual poderá estar alterada sem que haja uma alteração na sua expressão total. Tal foi observado no estudo de Egawa *et al.* (2009), no qual não foram observadas alterações na expressão total da AMPK, porém a cafeína aumentava a fosforilação da AMPK α Thr¹⁷² de uma maneira dependente da dose. Todavia, é de referir que no estudo de Egawa *et al.* (2009), foram utilizadas concentrações de cafeína muito superiores (1 - 15mM) às utilizadas no presente trabalho (0,001 - 0,5 μ M), sendo estas tóxicas para a célula, uma vez que envolvem a saída de cálcio dos depósitos intracelulares e, como tal, toxicidade induzida pelo cálcio (Fredholm *et al.*, 1999).

Quanto à expressão dos transportadores Glut4, observou-se um decréscimo da sua expressão em 34,98%, para uma concentração de 0,5 μ M de cafeína, ao contrário do estudo de Egawa *et al.* (2009), no qual não foram observadas alterações na expressão total de Glut4, mesmo tendo sido utilizada uma concentração de 3mM de cafeína. Contudo, para avaliar o envolvimento dos transportadores Glut4 no mecanismo de acção da cafeína na sensibilidade à insulina, terá de se estudar futuramente a captação de glucose no músculo-esquelético. Neste caso, existem estudos que demonstram que a cafeína, em concentrações superiores a 3mM, inibe o transporte de glucose estimulado pela insulina no músculo-esquelético (Kolnes *et al.*, 2010). Também no tecido adiposo foi observado que a cafeína diminui a captação de glucose induzida pela insulina de uma maneira dependente da dose (0,1 - 1mM) (Akiba *et al.*, 2004). Deste modo, a diminuição da expressão total de Glut4 no músculo-esquelético observada no presente trabalho poderia dever-se ao antagonismo dos receptores de adenosina A₁, o que estaria de acordo com o trabalho de Han *et al.* (1998), no qual foi observado que a inibição destes receptores diminuía o transporte de glucose estimulado pela insulina. Por outro lado, pode-se também estar perante um efeito ao nível dos receptores A_{2B} no músculo-esquelético, tal como descrito por Figler *et al.* (2011). Assim, pode-se postular que são os receptores A₁ e/ou A_{2B} que estão envolvidos na diminuição da captação de glucose no músculo-esquelético observada na resistência à insulina. Contudo, para avaliar esta hipótese ter-se-á de averiguar futuramente a expressão de transportadores Glut4 e a captação de glucose no músculo-esquelético e tecido adiposo, na presença de agonistas e/ou antagonistas selectivos para estes receptores de adenosina A₁ e A_{2B}.

No presente trabalho, obteve-se também resultados preliminares para o efeito da administração aguda de cafeína sobre as catecolaminas circulantes. Observou-se, que a cafeína quando administrada agudamente aumenta os níveis de epinefrina e norepinefrina circulantes, sendo o aumento de epinefrina superior, sugerindo um efeito desta xantina ao nível da medula adrenal. Este aumento de epinefrina pela administração aguda de cafeína poderá então, contribuir também, para a resistência à insulina observada nestes ratos, uma vez que foi demonstrado que a epinefrina promove a produção hepática de glucose, através da estimulação da gluconeogénese (Exton e Park, 1968) e da glicogenólise (Sherline *et al.*, 1972) e, inibe a captação de glucose no músculo e no tecido adiposo (Keijzers *et al.*, 2002). De facto, Deibert e DeFronzo (1980) observaram que a epinefrina diminui a sensibilidade à insulina em cerca de 50% durante um *clamp* euglicémico. Contudo, num estudo posterior realizado por Battram *et al.* (2007), demonstrou-se que o efeito da cafeína na sensibilidade à insulina, não se deve exclusivamente à epinefrina, ocorrendo um mecanismo que não sendo idêntico, pode estar relacionado e partilhar algumas vias, sugerindo estes autores que o efeito seja mediado pelo antagonismo dos receptores de adenosina. Assim, tendo em conta que no presente trabalho se demonstrou que o efeito da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina é mediado pelos receptores de adenosina e que, se observou também um aumento dos níveis de catecolaminas circulantes, pode-se postular, que o efeito da cafeína nas catecolaminas e como tal, na sensibilidade à insulina, poderá ser mediado também pelos receptores de adenosina. Será então necessário averiguar no futuro, se a administração aguda dos diferentes antagonistas selectivos da adenosina, modula os níveis de catecolaminas circulantes. Para além disso, e uma vez que se observou um aumento superior de epinefrina, poder-se-á também estudar o efeito dos diferentes antagonistas selectivos da adenosina no conteúdo em catecolaminas da medula adrenal, o principal órgão produtor de epinefrina.

4.2. Efeitos da administração crónica dos antagonistas dos receptores de adenosina

Relativamente à administração crónica dos antagonistas dos diferentes receptores de adenosina sobre a PAM, observou-se que o DPCPX e o SCH58261, antagonistas dos receptores A₁ e A_{2A} não modificaram significativamente a PAM no grupo controlo. Estes efeitos não são facilmente explicáveis uma vez que, estão em total desacordo com o efeito hipotensor previamente descrito para a adenosina e mediado perifericamente pelos receptores A₁ e A_{2A} (Watt e Routledge, 1985; Belardinelli *et al.*, 1989). No entanto, não se pode deixar de referir que na presente situação se está perante o bloqueio crónico dos vários subtipos de receptores, podendo-se estar na presença de fenómenos como dessensibilização, *up-regulation* e *down-regulation* de receptores, entre outros. Assim, pode-se postular que a ausência de efeitos do DPCPX assim como, do SCH58261 no grupo

controle, se deve a uma dessensibilização destes receptores devido à administração crónica destes antagonistas. Demonstrou-se também, que o MRS1754, antagonista dos receptores A_{2B} , diminuiu significativamente a PAM no grupo controle. Sabendo que os receptores A_{2B} estão envolvidos no controle hipotalâmico da pressão arterial, diminuindo os seus agonistas a PAM (Lee e Koh, 2009), seria esperado obter um aumento da mesma na presença de MRS1754. Contudo, e tal como citado anteriormente para o DPCPX e SCH58261, no caso do MRS1754 também se está na presença de um bloqueio crónico dos receptores e, como tal, pode-se estar perante um fenómeno de dessensibilização.

No presente trabalho demonstrou-se também, tal como seria de esperar e, como está descrito anteriormente, um aumento significativo da PAM nos ratos submetidos à dieta rica em sacarose (Conde *et al.*, 2012), diminuindo este aumento com a administração crónica de DPCPX e MRS1754. Neste caso, pode-se postular que, em situações patológicas, tal como as existentes nos ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose, existam alterações ao nível da expressão dos receptores de adenosina que influenciam a acção deste mediador e, a acção do bloqueio pelos seus antagonistas. Assim, é possível sugerir que, no caso da diminuição da PAM pelo DPCPX nos ratos HSu, esteja envolvido ou uma dessensibilização dos receptores A_1 ou, uma sobreexpressão dos mesmos. No caso da total reversão do aumento da PAM pelo MRS1754 nos animais submetidos a uma dieta HSu, pode-se postular ou o mesmo mecanismo anteriormente citado para os A_1 ou, que o MRS1754 esteja a exercer o seu efeito ao nível dos quimiorreceptores periféricos do corpo carotídeo. Tendo em conta que a adenosina exerce um efeito excitatório nos quimiorreceptores da carótida e da aorta e, nos nervos sensoriais do rim, coração e músculo-esquelético, sendo que a activação destes nervos aferentes resulta no aumento da actividade do sistema nervoso simpático e da pressão arterial (Daniels *et al.*, 1998); e sabendo que os efeitos da adenosina no corpo carotídeo são mediados via receptores A_{2A} e A_{2B} (Conde *et al.*, 2006; Conde *et al.*, 2008) e que, o corpo carotídeo aumenta o fluxo simpático (Marshall *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 2001) através da activação directa das adrenais, do rim e da actividade do sistema nervoso simpático (Schultz *et al.*, 2007), pode-se sugerir que a acção da adenosina no corpo carotídeo possa modular a pressão arterial.

No presente estudo também foi demonstrado que a administração crónica dos antagonistas dos receptores de adenosina não exerceu qualquer efeito ao nível da glicémia no grupo controle. No entanto, a administração crónica de DMSO reverteu para valores controle a hiperglicémia observada em ratos submetidos à dieta HSu (Conde *et al.*, 2012). Este efeito da administração crónica do DMSO pode dever-se a um aumento na translocação dos Glut4 na superfície celular (Berenguer *et al.*, 2011), o que provocaria o aumento da captação de glucose e, por consequência, os níveis de glicémia no plasma diminuiriam. No trabalho de Berenguer *et al.* (2011) o aumento da translocação dos Glut4 deveu-se à redução da sua endocitose, no entanto foi observado que o DMSO diminui a actividade

dos transportadores de glucose, havendo por isso, uma diminuição da captação de glucose. Contudo, há que ter em conta que o trabalho de Berenguer *et al.* (2011) foi realizado numa linha celular de adipócitos e, no músculo-esquelético o efeito do DMSO pode não ser o mesmo, podendo o DMSO aumentar a translocação dos Glut4 sem inibir a sua actividade. Assim, futuramente terão de ser realizados estudos nos quais se averiguará o efeito crónico do DMSO na glicémia basal e, na captação de glucose no músculo-esquelético em animais controlo e submetidos a dieta hipercalórica. Observou-se também, que o DPCPX aumenta a glicémia basal, contudo, foi um aumento para um valor de 108 mg/dl, que se encontra abaixo dos valores de referência para o diagnóstico de diabetes tipo 2 segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (glicémia em jejum > 126mg/dl; WHO, 2006).

Quanto à sensibilidade à insulina, a administração crónica de MRS1754 diminuiu significativamente a sensibilidade à insulina em animais controlo. Por outro lado, a mesma administração em ratos submetidos à dieta HSu reverteu quase completamente a resistência à insulina induzida pela dieta. A diferença de valores de K_{ITT} entre o controlo e os animais HSu submetidos à administração crónica de MRS1754 parece indicar que outros receptores de adenosina, para além dos A_{2B} , podem estar envolvidos na regulação da sensibilidade à insulina. Uma das possibilidades será os receptores A_1 , uma vez que se observou um aumento do K_{ITT} com a administração crónica de DPCPX, apesar de não significativo. Por outro lado, também pode ocorrer uma contribuição dos receptores A_{2A} , contudo o antagonismo crónico destes receptores em ratos HSu terá de ser estudado, pois não foi analisado no presente trabalho. Tendo em conta a hipótese de ocorrer sobreexpressão dos receptores de adenosina com a administração crónica dos antagonistas ou uma dessensibilização dos mesmos, no caso da sensibilidade à insulina, esta teoria por si só, não explicaria o facto do MRS1754 exercer efeitos opostos em ratos controlo e ratos HSu. Assim, pode-se sugerir que os receptores de adenosina possam de algum modo interagir com os receptores de insulina e, como tal, modular a própria acção da insulina quer em situações controlo, quer patológicas. Assim, nos ratos submetidos à dieta HSu, os quais são resistentes à insulina e, como tal teriam uma menor expressão dos receptores de insulina e/ou sinalização, a adenosina iria exercer um papel sensibilizador, aumentando a sensibilidade a esta hormona. Contudo, estudos terão de ser realizados, de modo a avaliar a possível interacção entre os receptores de adenosina e insulina bem como, a expressão dos receptores de adenosina no músculo-esquelético e no tecido adiposo, pois estes são tecidos sensíveis à insulina que desempenham um papel fundamental na resistência à insulina.

Relativamente à gordura total, observou-se um aumento com a dieta HSu, que pode estar associado ao aumento observado na gordura visceral destes ratos, a qual está associada à resistência

à insulina (Frayn, 2000). Assim, estes resultados estão de acordo com o observado por Kim *et al.* (2009), os quais observaram um aumento da gordura visceral em ratos submetidos à dieta HSu. A administração crónica de MRS1754 aumentou a gordura total no grupo HSu, contudo este aumento não está associado a um aumento da gordura visceral. Provavelmente ocorre uma redistribuição da gordura, podendo a gordura renal e/ou genital estarem aumentadas. Dado que no decurso deste trabalho não foi avaliada a gordura renal e genital, futuramente terá de se averiguar o efeito dos diferentes antagonistas dos receptores de adenosina quer ao nível da redistribuição de gordura, quer ao nível do efeito dos antagonistas sobre os diferentes tipos de gordura (branca/castanha). No caso da administração crónica de DPCPX em ratos HSu, observou-se a reversão da quantidade de gordura visceral para valores similares aos encontrados em animais controlo. Considerando a hipótese da sobreexpressão dos receptores de adenosina, a adenosina iria ligar-se aos receptores A_1 e, exerceria o seu efeito antilipolítico. Contudo, no trabalho de Greenberg *et al.* (2006) este sugere que o consumo crónico de café pode ajudar na perda de peso através da redução da gordura, o que ocorre pelo aumento do metabolismo dos lípidos, havendo por isso, um aumento da lipólise. Na tentativa de esclarecer se este efeito se deve a um aumento da lipólise ou devido à acção antilipolítica, ter-se-á futuramente de estudar a expressão dos receptores de adenosina no tecido adiposo bem como, os níveis de ácidos gordos livres.

De maneira a investigar o mecanismo pelo qual a administração crónica de cafeína modula a sensibilidade à insulina, estudou-se também o efeito da cafeína na expressão de Glut4 e AMPK α 1 e, na fosforilação da AMPK α 1 Thr¹⁷² no músculo-esquelético. Relativamente à expressão de Glut4, esta está diminuída nos ratos submetidos à dieta HSu, o que poderia explicar o facto de em ratos HSu ocorrer uma diminuição do transporte de glucose estimulado pela insulina no músculo-esquelético (Kim *et al.*, 1999). Porém, o consumo crónico de cafeína não exerceu qualquer efeito ao nível da expressão de Glut4. Quanto à expressão da AMPK α 1 esta diminui nos ratos submetidos à dieta HSu e HF sendo que, o consumo crónico de cafeína aumenta a expressão da AMPK α 1 nos HSu e, reverte na totalidade a sua expressão nos ratos HF. Contudo, este aumento da expressão da AMPK α 1 nos ratos submetidos à dieta HSu e HF, não é acompanhado pelo aumento da actividade da AMPK α 1, o que indica que no mecanismo pelo qual o consumo crónico de cafeína modula a sensibilidade à insulina, não está envolvida a AMPK α 1. Em relação à acção da cafeína sobre os transportadores Glut4 e, apesar do consumo crónico desta xantina não alterar a sua expressão, estes resultados não excluem uma possível acção desta substância na sensibilidade à insulina, uma vez que embora na ausência de modificações ao nível da expressão dos transportadores, poder-se-á estar na presença de alterações na captação de glucose. Sabendo que a adenosina está associada ao aumento do transporte de glucose estimulado pela insulina e, ao aumento dos transportadores Glut4 na membrana plasmática no tecido adiposo e no músculo-esquelético, via receptores A_1 (Kuroda *et al.*, 1987; Steinfelder e

Pethö-Schramm, 1990; Han *et al.*, 1998; Ferrara e Cushman, 1999), será então necessário avaliar a acção da cafeína/adenosina quer ao nível da translocação dos transportadores Glut4 para a membrana, quer ao nível da captação de glucose no músculo-esquelético e tecido adiposo.

Por último, mas não menos importante, no presente trabalho, após se demonstrar que o efeito da administração aguda e crónica de cafeína é mediado pelos receptores de adenosina, iniciou-se o estudo da presença dos diferentes subtipos de receptores no músculo-esquelético, dado o seu papel relevante como principal tecido captador de glucose. Demonstrou-se que os receptores A_{2A} estão presentes no músculo-esquelético soleus, contudo ainda não houve a possibilidade de averiguar a presença quer dos A_1 e dos A_{2B} . Assim, é necessária a continuação deste estudo, não só no músculo-esquelético como, no tecido adiposo, com o objectivo de se compreender quais os receptores que estão presentes nestes tecidos, bem como, os seus níveis de expressão. Deste modo, no futuro pretende-se investigar quais são os receptores que no músculo-esquelético e no tecido adiposo medeiam o efeito da administração crónica e aguda da cafeína na sensibilidade à insulina.

5. Conclusão

Pelos resultados obtidos no presente trabalho é possível afirmar e, pela primeira vez, que os receptores de adenosina envolvidos no efeito da administração aguda de cafeína na sensibilidade à insulina são os receptores A_1 e os A_{2B} . No mecanismo pelo qual a cafeína e, por consequência, os receptores A_1 e os A_{2B} , modulam a sensibilidade, estão envolvidos os transportadores de glucose Glut4 no músculo-esquelético.

Com o presente trabalho, também foi possível concluir que a administração crónica de MRS1754 reverte a hipertensão e, reverte quase na totalidade a resistência à insulina em ratos submetidos a uma dieta hipercalórica rica em sacarose. Na reversão da resistência à insulina também poderão estar envolvidos os receptores A_1 e/ou A_{2A} , contudo estes últimos não foram estudados no decurso deste trabalho. A administração crónica de DPCPX, por sua vez, reverteu a gordura visceral nos ratos submetidos à dieta rica em sacarose para valores similares ao controlo. Porém, para uma total clarificação dos resultados obtidos com a administração crónica dos diferentes antagonistas dos receptores de adenosina, ter-se-ão de realizar estudos quer de expressão dos diferentes subtipos de receptores de adenosina, quer da possível interacção entre os receptores de insulina e adenosina.

6. Trabalhos Futuros

Este trabalho teve como propósito a realização do trabalho experimental conducente à Dissertação referente ao 2º ano do Mestrado em Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, no entanto, e dado que um ano é um período de tempo curto para a aprendizagem de novas técnicas e obtenção de resultados, ficam por realizar e aprofundar várias questões que serão nesta secção abordadas como trabalhos futuros. O primeiro ponto destes trabalhos futuros refere-se à continuação do estudo da presença dos diferentes receptores de adenosina no músculo-esquelético e no tecido adiposo.

O segundo ponto destes trabalhos futuros refere-se ao aumento do número de experiências, nomeadamente no estudo do efeito da administração aguda de cafeína sobre as catecolaminas circulantes, visto o número de experiências em alguns grupos ser ainda baixo e, assim, o erro existente em alguns grupos ser relativamente elevado. De igual forma, pretende-se clarificar no futuro, o papel da administração aguda versus crónica de cafeína/adenosina na actividade do sistema nervoso simpático e, como tal, nas catecolaminas circulantes, assim como, no controlo da libertação/conteúdo das catecolaminas da medula adrenal.

Outro ponto que se pretende clarificar seria o papel da cafeína na modulação da actividade da AMPK assim como, dos transportadores Glut4 na sensibilidade à insulina. Para atingir o primeiro objectivo, ter-se-á de estudar a fosforilação da AMPK, tal como foi efectuado para a administração crónica de cafeína. Para o segundo objectivo será indispensável o estudo da captação de glucose no músculo-esquelético. Para além disso, para se perceber se a administração aguda de cafeína conduz a um aumento da lipólise, o que ocorre na resistência à insulina, ter-se-ão de quantificar os níveis de ácidos gordos livres.

Quanto ao efeito da administração crónica de cafeína na sensibilidade à insulina, é crucial o estudo da administração crónica de SCH58261 em ratos submetidos à dieta HSu, para se descobrir se os receptores de adenosina A_{2A} estão envolvidos no efeito do consumo crónico da cafeína. Para compreender os efeitos da administração crónica dos diferentes antagonistas dos receptores de adenosina na sensibilidade à insulina será necessária também, a quantificação dos níveis de insulina e ácidos gordos livres.

É também fundamental o estudo da expressão dos diferentes receptores de adenosina no músculo-esquelético e tecido adiposo, de modo a compreender os mecanismos envolvidos em alguns dos resultados obtidos no presente trabalho.

Assim, constata-se que muito está por esclarecer nos mecanismos fisiopatológicos que estão por detrás do efeito do consumo agudo e crónico de cafeína na resistência à insulina assim como, na modulação destes efeitos pela adenosina.

7. Bibliografia

- Akiba T, Yaguchi K, Tsutsumi K, Nishioka T, Koyama I, Nomura M, Yokogawa K, Moritani S, Miyamoto K. (2004) Inhibitory mechanism of caffeine on insulin-stimulated glucose uptake in adipose cells. *Biochem Pharmacol.* 68(10):1929-1937.
- Arch JR, Newsholme EA. (1978) Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem J.* 174(3): 965-977.
- Arner P. (2005) Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 19(4):471-482.
- Bartrons R, Schaftingen EV, Hers HG. (1984) The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. A cyclic AMP-mediated effect. *Biochem J.* 218(1): 157-163.
- Battram DS, Graham TE, Dela F. (2007) Caffeine's impairment of insulin-mediated glucose disposal cannot be solely attributed to adrenaline in humans. *J Physiol.* 583(Pt 3): 1069-1077.
- Belardinelli L, Linden J, Berne RM. (1989) The cardiac effects of adenosine. *Prog Cardiovasc Dis.* 32(1):73-97.
- Berenguer M, Zhang J, Bruce MC, Martinez L, Gonzalez T, Gurtovenko AA, Xu T, Le Marchand-Brustel Y, Govers R. (2011) Dimethyl sulfoxide enhances GLUT4 translocation through a reduction in GLUT4 endocytosis in insulin-stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Biochimie.* 93(4):697-709.
- Bergman RN. (2000) Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein? *Diabetologia.* 43(7):946-952.
- Biaggioni I, Paul S, Puckett A, Arzubia C. (1991) Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 258(2):588-593.
- Boden G, Chen X. (1995) Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 96(3): 1261-1268.
- Boden G, Chen X, Capulong E, Mozzoli M. (2001) Effects of free fatty acids on gluconeogenesis and autoregulation of glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes.* 50(4):810-816.
- Boden G, Shulman GI. (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 32 Suppl 3:14-23.
- Budohoski L, Challiss RA, Cooney GJ, McManus B, Newsholme EA. (1984) Reversal of dietary-induced insulin resistance in muscle of the rat by adenosine deaminase and an adenosine-receptor antagonist. *Biochem J.* 224(1):327-330.
- Budohoski L, Challiss RA, McManus B, Newsholme EA. (1984) Effects of analogues of adenosine and methyl xanthines on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. *FEBS Lett.* 167(1):1-4.

- Buxton DB, Fisher RA, Robertson SM, Olson MS. (1987) Stimulation of glycogenolysis and vasoconstriction by adenosine and adenosine analogues in the perfused rat liver. *Biochem J.* 248(1): 35-41.
- Camp PE, James HE, Werner R. (1981) Acute dimethyl sulfoxide therapy in experimental brain edema: Part I. Effects on intracranial pressure, blood pressure, central venous pressure, and brain water and electrolyte content. *Neurosurgery.* 9(1):28-33.
- Cao WH, Morrison SF. (2001) Differential chemoreceptor reflex responses of adrenal preganglionic neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(6):R1825-1832.
- Challiss RA, Budohoski L, McManus B, Newsholme EA. (1984) Effects of an adenosine-receptor antagonist on insulin-resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. *Biochem J.* 221(3): 915-917.
- Conde SV, Gonzalez C, Batuca JR, Monteiro EC, Obeso A. (2008) An antagonistic interaction between A2B adenosine and D2 dopamine receptors modulates the function of rat carotid body chemoreceptor cells. *J Neurochem.* 107(5):1369-1381.
- Conde SV, Monteiro EC, Obeso A, Gonzalez C. (2009) Adenosine in peripheral chemoreception: new insights into a historically overlooked molecule - invited article. *Adv Exp Med Biol.* 648:145-159.
- Conde SV, Nunes da Silva T, Gonzalez C, Mota Carmo M, Monteiro EC, Guarino MP. (2012) Chronic caffeine intake decreases circulating catecholamines and prevents diet-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Br J Nutr.* 107(1):86-95.
- Conde SV, Obeso A, Vicario I, Rigual R, Rocher A, Gonzalez C. (2006) Caffeine inhibition of rat carotid body chemoreceptors is mediated by A2A and A2B adenosine receptors. *J Neurochem.* 98(2):616-628.
- Crist GH, Xu B, Lanoue KF, Lang CH. (1998) Tissue-specific effects of in vivo adenosine receptor blockade on glucose uptake in Zucker rats. *FASEB J.* 12(13):1301-1308.
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. (2000) Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest.* 105(3):311-320.
- Daniels JW, Molé PA, Shaffrath JD, Stebbins CL. (1998) Effects of caffeine on blood pressure, heart rate, and forearm blood flow during dynamic leg exercise. *J Appl Physiol.* 85(1):154-159.
- Daval M, Fougelle F, Ferré P. (2006) Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol.* 574(Pt 1): 55-62.
- DeFronzo RA. (2004) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 88(4):787-835.
- DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, Olsson M, Wahren J. (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 76(1): 149-155.
- Deibert DC, DeFronzo RA. (1980) Epinephrine-induced insulin resistance in man. *J Clin Invest.* 65(3): 717-721.

- Dhalla AK, Wong MY, Voshol PJ, Belardinelli L, Reaven GM. (2007) A1 adenosine receptor partial agonist lowers plasma FFA and improves insulin resistance induced by high-fat diet in rodents. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(5):E1358-1363.
- Dixon AK, Gubitzi AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol.* 118(6):1461-1468.
- Dong Q, Ginsberg HN, Erlanger BF. (2001) Overexpression of the A1 adenosine receptor in adipose tissue protects mice from obesity-related insulin resistance. *Diabetes Obes Metab.* 3(5):360-366.
- Egawa T, Hamada T, Kameda N, Karaike K, Ma X, Masuda S, Iwanaka N, Hayashi T. (2009) Caffeine acutely activates 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and increases insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscles. *Metabolism.* 58(11):1609-1617.
- Egawa T, Hamada T, Ma X, Karaike K, Kameda N, Masuda S, Iwanaka N, Hayashi T. (2011) Caffeine activates preferentially α 1-isoform of 5'AMP-activated protein kinase in rat skeletal muscle. *Acta Physiol.* 201(2):227-238.
- Espinal J, Challiss RA, Newsholme EA. (1983) Effect of adenosine deaminase and an adenosine analogue on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. *FEBS Lett.* 158(1):103-106.
- Exton JH, Park CR. (1968) Control of gluconeogenesis in liver. II. Effects of glucagon, catecholamines, and adenosine 3',5'-monophosphate on gluconeogenesis in the perfused rat liver. *J Biol Chem.* 243(16):4189-4196.
- Faulhaber-Walter R, Jou W, Mizel D, Li L, Zhang J, Kim SM, Huang Y, Chen M, Briggs JP, Gavrilova O, Schnermann JB. (2011) Impaired glucose tolerance in the absence of adenosine A1 receptor signaling. *Diabetes.* 60(10):2578-2587.
- Ferrara CM, Cushman SW. (1999) GLUT4 trafficking in insulin-stimulated rat adipose cells: evidence that heterotrimeric GTP-binding proteins regulate the fusion of docked GLUT4-containing vesicles. *Biochem J.* 343(3):571-577.
- Figler RA, Wang G, Srinivasan S, Jung DY, Zhang Z, Pankow JS, Ravid K, Fredholm B, Hedrick CC, Rich SS, Kim JK, LaNoue KF, Linden J. (2011) Links between insulin resistance, adenosine A2B receptors, and inflammatory markers in mice and humans. *Diabetes.* 60(2):669-679.
- Firth RG, Bell PM, Marsh HM, Hansen I, Rizza RA. (1986) Postprandial hyperglycemia in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of hepatic and extrahepatic tissues. *J Clin Invest.* 77(5): 1525-1532.
- Frayn KN. (2000) Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative? *Br J Nutr.* 83 Suppl 1:S71-77.
- Fredholm BB. (1978) Effect of adenosine, adenosine analogues and drugs inhibiting adenosine inactivation on lipolysis in rat fat cells. *Acta Physiol Scand.* 102(2):191-198.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev.* 46(2):143-156.
- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362(4-5):364-374.

- Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 51(1):83-133.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 53(4):527-552.
- Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, Mesquita AC, Fona C, Carvalho R, Massano-Cardoso S. (2010) First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabet Med.* 27(8):879-881.
- Greenberg JA, Boozer CN, Geliebter A. (2006) Coffee, diabetes, and weight control. *Am J Clin Nutr.* 84(4):682-693.
- Greer F, Hudson R, Ross R, Graham T. (2001) Caffeine ingestion decreases glucose disposal during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp in sedentary humans. *Diabetes.* 50(10):2349-2354.
- Gruzman A, Babai G, Sasson S. (2009) Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) as a New Target for Antidiabetic Drugs: A Review on Metabolic, Pharmacological and Chemical Considerations. *Rev Diabet Stud.* 6(1): 13-36.
- Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Holloszy JO. (1998) Removal of adenosine decreases the responsiveness of muscle glucose transport to insulin and contractions. *Diabetes.* 47(11):1671-1675.
- Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. (2001) Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med.* 345(11):790-797.
- Hu G, Jousilahti P, Peltonen M, Bidel S, Tuomilehto J. (2006) Joint association of coffee consumption and other factors to the risk of type 2 diabetes: a prospective study in Finland. *Int J Obes.* 30(12):1742-1749.
- Hulman S, Falkner B. (1994) The effect of excess dietary sucrose on growth, blood pressure, and metabolism in developing Sprague-Dawley rats. *Pediatr Res.* 36(1 Pt 1):95-101.
- IUPHAR (2012) IUPHAR Database of the Receptor Nomenclature and Drug Classification. <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=3>, último acesso a 4 de Setembro de 2012.
- James HE, Camp PE, Harbaugh RD, Marshall LF, Werner R. (1982) Comparison of the effects of DMSO and pentobarbitone on experimental brain oedema. *Acta Neurochir (Wien).* 60(3-4):245-255.
- Johansson SM, Lindgren E, Yang JN, Herling AW, Fredholm BB. (2008) Adenosine A1 receptors regulate lipolysis and lipogenesis in mouse adipose tissue-interactions with insulin. *Eur J Pharmacol.* 597(1-3):92-101.
- Johansson SM, Salehi A, Sandström ME, Westerblad H, Lundquist I, Carlsson PO, Fredholm BB, Katz A. (2007) A1 receptor deficiency causes increased insulin and glucagon secretion in mice. *Biochem Pharmacol.* 74(11):1628-1635.
- Johnston-Cox H, Koupenova M, Yang D, Corkey B, Gokce N, Farb MG, LeBrasseur N, Ravid K. (2012) The a2b adenosine receptor modulates glucose homeostasis and obesity. *PLoS One.* 7(7):e40584.

- Kahn SE. (2000) The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 108 Suppl 6a:2S-8S.
- Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K. (2003) A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes.* 52(10):2461-2474.
- Kashyap SR, DeFronzo RA. (2007) The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diab Vasc Dis Res.* 4(1):13-19.
- Kaufman LN, Peterson MM, Smith SM. (1991) Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. *Am J Physiol.* 260(1 Pt 1):E95-100.
- Keijzers GB, De Galan BE, Tack CJ, Smits P. (2002) Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care.* 25(2):364-369.
- Kim YC, Ji X, Melman N, Linden J, Jacobson KA. (2000) Anilide derivatives of an 8-phenylxanthine carboxylic congener are highly potent and selective antagonists at human A(2B) adenosine receptors. *J Med Chem.* 43(6):1165-1172.
- Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Kawanaka K, Holloszy JO. (1999) Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. *Am J Physiol.* 276(3 Pt 2):R665-672.
- Kolnes AJ, Ingvaldsen A, Bolling A, Stuenkel JT, Kreft M, Zorec R, Shepherd PR, Jensen J. (2010) Caffeine and theophylline block insulin-stimulated glucose uptake and PKB phosphorylation in rat skeletal muscles. *Acta Physiol.* 200(1):65-74.
- Kuroda M, Honnor RC, Cushman SW, Londos C, Simpson IA. (1987) Regulation of insulin-stimulated glucose transport in the isolated rat adipocyte. cAMP-independent effects of lipolytic and antilipolytic agents. *J Biol Chem.* 262(1): 245-253.
- Lane JD, Barkauskas CE, Surwit RS, Feinglos MN. (2004) Caffeine impairs glucose metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 27(8):2047-2048.
- Langin D. (2006) Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res.* 53(6):482-491.
- Latini S, Pedata F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 79(3):463-484.
- Lee TK, Koh HC. (2009) Involvement of NO and KATP channel in adenosine A2B receptors induced cardiovascular regulation in the posterior hypothalamus of rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 53(2):167-172.
- Lindström J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson JG, Hemiö K, Hämäläinen H, Härkönen P, Keinänen-Kiukkaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Manninen M, Paturi M, Sundvall J, Valle TT, Uusitupa M, Tuomilehto J. (2006) Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet.* 368(9548): 1673-1679.

- Lohse MJ, Klotz KN, Lindenborn-Fotinos J, Reddington M, Schwabe U, Olsson RA. (1987) 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) - a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 336(2): 204-210.
- Lopez-Garcia E, van Dam RM, Qi L, Hu FB. (2006) Coffee consumption and markers of inflammation and endothelial dysfunction in healthy and diabetic women. *Am J Clin Nutr.* 84(4):888-893.
- Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. (1992) Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest.* 90(4): 1323-1327.
- Marshall JM. (1994) Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 74(3):543-594.
- Meyer KA, Kushi LH, Jacobs DR Jr, Slavin J, Sellers TA, Folsom AR. (2000) Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. *Am J Clin Nutr.* 71(4):921-930.
- Mishina M, Ishiwata K, Kimura Y, Naganawa M, Oda K, Kobayashi S, Katayama Y, Ishii K. (2007) Evaluation of distribution of adenosine A2A receptors in normal human brain measured with [¹¹C]TMSX PET. *Synapse.* 61(9):778-784.
- Moisey LL, Kacker S, Bickerton AC, Robinson LE, Graham TE. (2008) Caffeinated coffee consumption impairs blood glucose homeostasis in response to high and low glycemic index meals in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 87(5):1254-1261.
- Petrie HJ, Chown SE, Belfie LM, Duncan AM, McLaren DH, Conquer JA, Graham TE. (2004) Caffeine ingestion increases the insulin response to an oral-glucose-tolerance test in obese men before and after weight loss. *Am J Clin Nutr.* 80(1):22-28.
- Poulsen SA, Quinn RJ. (1998) Adenosine Receptors: New Opportunities for Future Drugs. *Bioorg Med Chem.* 6(6):619-641.
- Ralevic V, Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50(3):413-492.
- Ribeiro RT, Lutt WW, Legare DJ, Macedo MP. (2005) Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia.* 48(5):976-983.
- Ribeiro MJ, Sacramento JF, Gonzalez C, Guarino MP, Monteiro EC, Conde SV. (2012) Carotid body: the missing piece in the puzzle of insulin resistance and sympathetic overactivation. (submetido)
- Ríos MS, Fuentes JAG. (2009) *Type 2 diabetes mellitus: The molecular and genetic basis of type 2 diabetes mellitus.* 1ª ed., Espanha, ELSEVIER, p. 53-54.
- Robertson D, Frölich JC, Carr RK, Watson JT, Hollifield JW, Shand DG, Oates JA. (1978) Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *N Engl J Med.* 298(4):181-186.
- Robinson LE, Savani S, Battram DS, McLaren DH, Sathasivam P, Graham TE. (2004) Caffeine ingestion before an oral glucose tolerance test impairs blood glucose management in men with type 2 diabetes. *J Nutr.* 134(10):2528-2533.
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. (1996) Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest.* 97(12): 2859-2865.

- Saltiel AR, Kahn CR. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414(6865):799-806.
- Schoelch C, Kuhlmann J, Gossel M, Mueller G, Neumann-Haefelin C, Belz U, Kalisch J, Biemer-Daub G, Kramer W, Juretschke HP, Herling AW. (2004) Characterization of adenosine-A1 receptor-mediated antilipolysis in rats by tissue microdialysis, ¹H-spectroscopy, and glucose clamp studies. *Diabetes*. 53(7):1920-196.
- Schultz HD, Li YL, Ding Y. (2007) Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure. *Hypertension*. 50(1):6-13.
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. (2010) Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 87(1):4-14.
- Sherline P, Lynch A, Glinsmann WH. (1972) Cyclic AMP and adrenergic receptor control of rat liver glycogen metabolism. *Endocrinology*. 91(3):680-690.
- Smith B, Wingard DL, Smith TC, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. (2006) Does coffee consumption reduce the risk of type 2 diabetes in individuals with impaired glucose? *Diabetes Care*. 29(11):2385-2390.
- Srinivasan K, Ramarao P. (2007) Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res*. 125(3):451-472.
- Steinfelder HJ, Pethö-Schramm S. (1990) Methylxanthines inhibit glucose transport in rat adipocytes by two independent mechanisms. *Biochem Pharmacol*. 40(5):1154-1157.
- Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW. (1986) Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol*. 251(5 Pt 1):E576-83.
- Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. (2006) Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr*. 136(3):582-587.
- Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. (2012) Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 379(9833):2279-2290.
- Thong FS, Lally JS, Dyck DJ, Greer F, Bonen A, Graham TE. (2007) Activation of the A1 adenosine receptor increases insulin-stimulated glucose transport in isolated rat soleus muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*. 32(4):701-710.
- Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 344(18):1343-1350.
- van Dam RM, Dekker JM, Nijpels G, Stehouwer CD, Bouter LM, Heine RJ. (2004) Coffee consumption and incidence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Diabetologia*. 47(12):2152-2159.
- van Dam RM, Feskens EJ. (2002) Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 360(9344):1477-1478.

- Vergauwen L, Hespel P, Richter EA. (1994) Adenosine receptors mediate synergistic stimulation of glucose uptake and transport by insulin and by contractions in rat skeletal muscle. *J Clin Invest.* 93(3):974-981.
- Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hébrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F. (2009) Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci.* 14: 3380-3400.
- Watson RT, Pessin JE. (2001) Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res.* 56:175-193.
- Watt AH, Routledge PA. (1985) Adenosine stimulates respiration in man. *Br J Clin Pharmacol.* 20(5): 503-506.
- World Health Organization (2006): Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultationWorld Health Organization, Geneva, http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf, último acesso a 4 de Setembro de 2012.
- Xu B, Berkich DA, Crist GH, LaNoue KF. (1998) A1 adenosine receptor antagonism improves glucose tolerance in Zucker rats. *Am J Physiol.* 274(2):E271-279.
- Yasuda N, Inoue T, Horizoe T, Nagata K, Minami H, Kawata T, Hoshino Y, Harada H, Yoshikawa S, Asano O, Nagaoka J, Murakami M, Abe S, Kobayashi S, Tanaka I. (2003) Functional characterization of the adenosine receptor contributing to glycogenolysis and gluconeogenesis in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 459(2-3):159-166.
- Zocchi C, Ongini E, Conti A, Monopoli A, Negretti A, Baraldi PG, Dionisotti S. (1996) The non-xanthine heterocyclic compound SCH 58261 is a new potent and selective A2a adenosine receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 276(2):398-404.

8. Anexos

Tabela 8.1. Efeito da administração de DMSO (veículo) no K_{ITT} , glicémia basal, PAM e gordura total e visceral, em ratos controlo e em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu). *** $p < 0,01$ em comparação com o grupo HSu (*One-Way ANOVA* com teste de comparação múltipla *Bonferroni*). (Os valores médios com os seus erros padrão foram obtidos a partir de 4 a 20 ratos)

| | Controlo | Veículo | HSu | HSu/Veículo |
|--|----------------------------|--------------|----------------------------|-----------------------------|
| K_{ITT} (%glucose/min) | 4,79 ± 0,35 ^a | 4,16 ± 0,28 | 2,24 ± 0,29 ^a | 2,48 ± 0,27 |
| Glicemia basal (mg/dl) | 100,40 ± 4,22 ^a | 90,56 ± 5,79 | 145,00 ± 9,56 ^a | 90,25 ± 8,14 ^{***} |
| PAM (mmHg) | 101,20 ± 3,35 ^a | 99,02 ± 9,47 | 133,50 ± 4,17 ^a | 137,80 ± 5,02 |
| Gordura total (g/kg) | 90,56 ± 4,22 ^b | 90,56 ± 5,79 | 52,79 ± 4,29 ^b | 67,51 ± 5,17 |
| Gordura visceral (g/kg) | 8,49 ± 0,64 ^b | 7,09 ± 0,64 | 12,16 ± 1,05 ^b | 9,65 ± 0,75 |

^{a)} Ribeiro *et al.*, submetido.

^{b)} Conde *et al.*, 2012.